

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dominik Oliver

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die Cav- und K_{Ca}/SK- Ionenkanalfamilien in Locus Coeruleus Neuronen der Maus

Funktionelle Charakterisierung und Implikationen für die Parkinson-Erkrankung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lina Matschke

geboren am 16. Oktober 1986 in Telgte

Marburg 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 10.Mai 2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Niels Decher

Korreferent: PD Dr. Karla Eggert

WIDMUNG

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
Summary	10
1. EINLEITUNG	12
1.1 Das Locus Coeruleus- Noradrenalin System	12
1.1.1 Funktionelle Anatomie des Locus Coeruleus.....	12
1.1.2 Physiologie coeruleärer Neurone	14
1.1.3 Funktionen des LC- Noradrenalin Systems	15
1.1.3.1 Klinische Korrelationen.....	16
1.2 Die Familie der spannungsgesteuerten Ca^{2+} Kanäle (Cav)	17
1.2.1 Aufbau und Funktion der Cav Kanäle	17
1.2.2 L-Typ Ca^{2+} Kanäle	18
1.2.2.2 Pharmakologie der L-Typ Ca^{2+} Kanäle	20
1.2.3 T-Typ Ca^{2+} Kanäle	21
1.2.3.1 Pharmakologie der T-Typ Ca^{2+} Kanäle	22
1.2.4 Die Rolle der Cav Kanäle in LC Neuronen	22
1.3 Die Familie der Kaliumselektiven Ionenkanäle	23
1.3.1 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv)	25
1.3.2 Ca^{2+} aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca}).....	26
1.3.2.1 Pharmakologie der SK Kanäle	28
1.3.2.2 SK Kanäle in LC Neuronen.....	29
1.4 Die Parkinson-Krankheit.....	29
1.4.1 Symptomatik und Pathogenese.....	29
1.4.2 Neurodegeneration und metabolischer Stress	32
1.4.3 <i>In vitro</i> Modellsysteme der Parkinson-Krankheit	33
1.5 Zielsetzungen	35
2. MATERIALIEN UND METHODEN	36
2.1 Material.....	36
2.1.1 Versuchstiere	36
2.1.2 Chemikalien und Geräte	36
2.1.3 Lösungen.....	36

2.1.3.1 Lösungen Molekularbiologie	36
2.1.3.2 Lösungen Elektrophysiologie	37
2.1.3.3 Lösungen Immunhistochemie	38
2.1.4 Enzyme/ Antikörper/ dNTPs	38
2.1.5 Oligonukleotide	39
2.2 Molekularbiologische Methoden	39
2.2.1 Gewinnung von LC Neuronen für die Expressionsanalyse	39
2.2.2 RNA-Isolation	39
2.2.3 RT-Reaktion	40
2.2.4 RT-PCR	40
2.2.4.1 Auswahl der Primer-Sequenzen	40
2.2.4.2 Standard PCR-Protokoll	43
2.2.4.3 Agarose - Gelelektrophorese	43
2.2.4.4 Aufreinigung und Verifizierung der PCR-Produkte	43
2.3 Elektrophysiologische Methoden	44
2.3.1 Präparation akuter Hirnschnitte	44
2.3.2 Der Patch-Clamp Messstand	45
2.3.2.1 Bildgebung	45
2.3.2.2 Pipetten und Pipettenhalterung	45
2.3.2.3 Applikationsverfahren	45
2.3.2.4 Datenaufnahme	46
2.3.3 Durchführung der Patch-Clamp Messungen	46
2.3.3.1 Die <i>Whole-Cell</i> Konfiguration	47
2.3.3.2 Die <i>Perforated-Patch</i> Konfiguration	48
2.3.4 Messprotokolle	48
2.3.4.1 Die Spannungsklemme (<i>Voltage-Clamp</i>)	48
2.3.4.2 Die Stromklemme (<i>Current-Clamp</i>)	49
2.3.4.3 Kapazitätskorrektur	49
2.3.5 Datenanalyse	49
2.4 Immunhistochemische Methoden	50
2.4.1 Perfusion, Präparation und Fixation der Hirnschnitte	50
2.4.2 DAB-/Nickel-Färbung	50
2.4.3 Neurobiotin und Fluoreszenz-Färbung	50

2.4.4 Stereologie.....	51
2.4.4.1 Gewebspräparation und Rotenon - Behandlung.....	51
2.4.4.2 Bestimmung der Anzahl TH immunoreaktiver Neurone	52
2.5 Calcium- Messungen primärer LC Neurone	53
2.5.1 Primärkulturen	53
2.5.2 Calcium Imaging	53
2.6 Statistische und weitere mathematische Auswertungen.....	54
3. ERGEBNISSE	55
3.1 Identifikation und elektrophysiologische Charakterisierung von LC Neuronen im Hirnschnittpräparat.....	55
3.1.1 Immunhistochemische Identifikation.....	55
3.1.2 Autonome Schrittmacheraktivität.....	55
3.2 RT-PCR Expressionsanalyse der LC Neurone	57
3.2.1 Spezifität und Sensitivität der RT-PCR.....	57
3.2.2 Expression spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Kv)	58
3.2.3 Expression weiterer Kaliumkanäle	59
3.3 Funktionelle Charakterisierung von L- und T-Typ Ca^{2+}-Kanälen in LC Neuronen	60
3.3.1 Identifikation einer „low-voltage“ aktivierten Ca^{2+} -Leitfähigkeit in LC Neuronen	60
3.3.2 Expression spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle.....	60
3.3.3 Identifikation L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelter Ströme in LC Neuronen	61
3.3.4. Regulation der Feuerrate durch simultane Blockade von L- und T-Typ Ca^{2+} Kanälen.....	64
3.4 Funktionelle Charakterisierung von SK Kanälen in LC Neuronen.....	67
3.4.1 Expression von SK Kanälen in LC Neuronen	67
3.4.2 Pharmakologie und Funktion der SK Kanäle in LC Neuronen.....	68
3.4.2.1 Blockierung SK Kanal-vermittelter Ströme durch Apamin	68
3.4.2.2 Aktivierung SK Kanal-vermittelter Ströme durch NS309.....	72
3.4.3 Neuroprotektives Potential der SK Kanal-Aktivierung	76
3.4.3.1 Antagonisierung der Glutamat bedingten Ca^{2+} - Überladung isolierter LC Neurone	76
3.4.3.2 Antagonisierung der Rotenon bedingten Ca^{2+} - Überladung isolierter LC Neurone	78
3.4.3.3 Antagonisierung der Rotenon bedingten Depolarisation von LC Neuronen im Hirnschnittpräparat	79
3.4.3.4 Die SK Kanal Aktivierung wirkt protektiv im <i>in vitro</i> Rotenon-Toxizitäts-Modell.....	83

4. DISKUSSION	85
4.1 Elektrophysiologischer Phänotyp und Ionenkanalexpression der LC Neurone	85
4.1.1 LC Neurone sind autonome Schrittmacher	85
4.1.2 Ionenkanal Expressionsprofil der LC Neurone	86
4.1.3 Limitationen der RT-PCR Expressionsanalyse.....	87
4.2 Das Zusammenspiel von L-Typ und T-Typ Ca^{2+} Kanälen reguliert den Schrittmachermechanismus muriner LC Neurone	88
4.2.1 LC Neurone exprimieren funktionelle „low-voltage“ aktivierte Ca^{2+} Kanäle	89
4.2.2 Anteil der L- und T-Typ Ca^{2+} Kanäle am Gesamt Ca^{2+} Strom der LC Neurone	90
4.2.3 Probleme bei der pharmakologischen Isolation L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelter Stromkomponenten	92
4.2.4 Physiologische Relevanz der L- und T-Typ Ca^{2+} Kanäle in LC Neuronen.....	93
4.3 Die Modulation der Schrittmacheraktivität von LC Neuronen durch SK Kanäle und ihre neuroprotektive Bedeutung	94
4.3.2 Funktionelle SK Kanäle formen den I_{NHP} muriner LC Neurone	95
4.3.3 SK Kanäle wirken als Schrittmacher-Modulatoren der LC Neurone.....	96
4.3.4 Neuroprotektiver Effekt der pharmakologischen SK Kanal Aktivierung	98
4.3.4.1 Normalisierung der Ca^{2+} Homöostase im Glutamat Exzitotoxizitätsmodell.....	98
4.3.4.2 Verhinderung der Rotenon-induzierten Neurodegeneration	99
4.4 Ausblick	102
5. LITERATURVERZEICHNIS	104
6. ANHÄNGE	119
6.1 Abkürzungssverzeichnis	119
6.2 Abbildungsverzeichnis	122
6.3 Eigene Publikationen	124
6.4 Liste der akademischen Lehrer.....	125
6.5 Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
6.6 Danksagung	126
6.7 Ehrenwörtliche Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Zusammenfassung

Der Locus Coeruleus (LC) ist ein noradrenerger Kern des Hirnstammes, der an der Regulation vielfältiger, physiologischer Prozesse beteiligt ist. Störungen des LC-Noradrenalin Systems sind in der Pathogenese verschiedener psychiatrischer und neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt und sind ein frühes Kennzeichen der Parkinson-Krankheit (PD). Während die Degeneration von Neuronen der Substantia Nigra pars compacta (SNpc) den motorischen Leitsymptomen der PD unterliegt, wird der ausgeprägte Verlust noradrenerger Neurone des LC für einen Großteil der nichtmotorischen Dysfunktionen dieser Erkrankung verantwortlich gemacht. Die Ursachen für die selektive Vulnerabilität der LC Neurone in der Pathogenese der PD sind bislang jedoch weitestgehend unklar. Um eine tonische Noradrenalin-Ausschüttung zu gewährleisten, verfügen LC Neurone über einen intrinsischen Schrittmachermechanismus, welcher direkt an intrazelluläre Überlebenssignalwege gekoppelt ist. So führt aktivitätsabhängiger, durch L-Typ Ca^{2+} Kanäle vermittelter Ca^{2+} Influx, zu oxidativem Stress in LC Neuronen und anderen von der PD Pathogenese betroffenen Kerngebieten. Des Weiteren wird eine neuroprotektive Rolle Ca^{2+} aktivierter Kaliumkanäle postuliert, welche den Schrittmachermechanismus dopaminerger SNpc Neurone modulieren. Die Identifikation von Ionenkanälen, die der elektrischen Aktivität unterliegen, kann somit zu einem besseren Verständnis der selektiven Vulnerabilität coeruleärer Neurone führen. Innerhalb dieser Arbeit wurden daher mittels RT-PCR Expressionsanalysen und Patch-Clamp Messungen in akuten Hirnstammschnitten die molekulare Komposition und Funktion verschiedener Ionenkanalfamilien in LC Neuronen der Maus charakterisiert.

Zunächst erstellte ich ein Profil bezüglich der elektrophysiologischen Charakteristika und der Expression kaliumselektiver Ionenkanäle coeruleärer Neurone. Diese Analysen zeigten, dass der elektrophysiologische Phänotyp der LC Neurone durch regelmäßige, breite Aktionspotenziale mit einer ausgeprägten Nachhyperpolarisation, die um ein depolarisiertes Membranpotenzial fluktuieren, gekennzeichnet ist. Mittels der Expressionsanalyse konnte ich die molekulare Komposition spannungsabhängiger Kaliumkanäle aufklären, die wahrscheinlich den A-Typ K^+ Strom und den persistierenden K^+ Strom der LC Neurone vermitteln. Als A-Typ Kaliumkanäle wurden unter anderem Kv4.3 sowie Kv1 in Kombination mit Kv β 1 detektiert, welche durch das oxidative Potenzial der Zelle reguliert werden und deshalb unter pathologischen Bedingungen mit gestörter Funktion der Mitochondrien von Bedeutung sein könnten. Des Weiteren detektierte ich Amplifikate der GIRK Kanal Unterheiten GIRK-1 und GIRK-4 sowie verschiedene K_2P Kanal-Untereinheiten, welche an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials zentraler Neurone beteiligt sind.

Zur funktionellen Charakterisierung spannungsabhängiger Ca^{2+} Kanäle führte ich RT-PCR Expressionsanalysen sowie Patch-Clamp Messungen in Kombination mit L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal Blockern durch. Diese Experimente zeigten, dass sowohl Ca^{2+} Kanäle der Unterfamilien Cav1 als auch Cav3 in LC Neuronen exprimiert sind und eine ausgeprägte „low voltage“ aktivierte Ca^{2+} Leitfähigkeit vermitteln. Die Analyse der Aktionspotenzial-Folgen ergab, dass weder die Inhibition von L- noch von T-Typ Ca^{2+} Kanälen allein die Feuerrate oder die Aktionspotenzial-Parameter der LC Neurone verändert. Die kombinierte Applikation der Kanal-Blocker führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Nachhyperpolarisation und daraus resultierend zu einer Beschleunigung der Feuerrate. Diese Ergebnisse beschreiben erstmals die funktionelle Expression von T-Typ Ca^{2+} Kanälen in LC Neuronen und demonstrieren ihre Rolle bei der Modulation des Schrittmachermechanismus im Zusammenspiel mit L-Typ Ca^{2+} Kanälen. T-Typ Ca^{2+} Kanäle sollten demnach neben den „low-voltage“ aktivierten L-Typ Ca^{2+} Kanälen als Kandidaten in Betracht gezogen werden, die aktivitätsabhängigen oxidativen Stress im Kontext pathologischer Bedingungen vermitteln könnten.

Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung Ca^{2+} aktivierter Kaliumkanäle detektierte ich die Expression der SK Kanal Familienmitglieder SK1, SK2 und SK3 in LC Neuronen. Mittels Patch-Clamp Messungen in Kombination mit dem selektiven SK Kanal Blocker Apamin und dem positiven SK Kanal Modulator NS309 konnte ich demonstrieren, dass SK Kanäle maßgeblich für die während der Nachhyperpolarisation fließenden K^{+} Auswärtsströme verantwortlich sind. Während Aufnahmen der Aktionspotenzialabfolgen bewirkte die Inhibition der SK Kanäle eine Reduktion der Nachhyperpolarisation und eine beschleunigte Feuerrate, während ihre Aktivierung zu einer Vergrößerung der Nachhyperpolarisation und einer verlangsamten Frequenz führte. SK Kanäle können demnach als wichtige Regulatoren der Schrittmacherfrequenz von LC Neuronen angesehen werden. Mittels Calcium Imaging Experimenten im *in vitro* Glutamat- und Rotenon-Toxizitätsmodell konnte ich darüber hinaus zeigen, dass die pharmakologische SK Kanal Aktivierung die Dysregulation der Ca^{2+} Homöostase unter toxischen Bedingungen verhindert. Mittels Patch-Clamp Messungen konnte ich erstmals demonstrieren, dass die akute Rotenon-Exposition eine Depolarisation und eine Steigerung der Aktionspotenzial-Frequenz in LC Neuronen induziert, welche durch die SK Kanal Aktivierung unterbunden werden konnte. Stereologische Analysen zeigten schließlich, dass die SK Kanal Aktivierung mit NS309 signifikant der Degeneration von LC Neuronen im *in vitro* Rotenon-Toxizitätsmodell entgegenwirkt. Die Aktivierung von SK Kanälen wird demnach als ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Neuroprotektion des LC während früher Stadien der PD Pathogenese postuliert.

Summary

The Locus Coeruleus (LC) is a noradrenergic nucleus of the brainstem that plays a major role in the regulation of versatile physiological processes. Dysfunction of the LC noradrenergic system is involved in psychiatric and neurodegenerative diseases and is an early hallmark of Parkinson's disease (PD). While degeneration of dopaminergic Substantia Nigra pars compacta (SNpc) neurons accounts for the motor symptoms observed in PD patients, the extensive loss of noradrenergic LC neurons is responsible for most of the non-motor symptoms that occur in early stages of the disease. However, the reasons why LC neurons are selectively vulnerable during the pathogenesis of PD are only poorly understood. To warrant a permanent release of Noradrenaline LC neurons possess an intrinsic pacemaking mechanism, which is ultimately coupled to cell survival signaling pathways. It is suggested that activity-dependent Ca^{2+} Influx, mediated by L-type Ca^{2+} channels, leads to mitochondrial oxidant stress in LC neurons and other PD-related brain regions. In addition, a neuroprotective function of Ca^{2+} activated potassium channels that modulate pacemaking of dopaminergic SNpc neurons, is proposed. Therefore, the analysis of ion channels underlying the autonomous electrical activity of LC neurons can lead to a better understanding of the vulnerability of these neurons. In the present study, I performed RT-PCR expression analysis and utilized patch-clamp recordings of *in vitro* brainstem slices to characterize the molecular composition and function of distinct ion channel families in mouse LC neurons.

First, a profile regarding the electrophysiological characteristics and the expression of potassium selective ion channels in LC neurons was compiled. These analyses revealed an electrophysiological phenotype of LC neurons that was marked by regular, broad action potentials with pronounced afterhyperpolarizations fluctuating around a depolarized membrane potential. Utilizing RT-PCR expression analyses the molecular composition of voltage dependent potassium channels that most probably mediate the A-type K^+ and the persistent K^+ currents of LC neurons was elucidated. Among others, the A-type channels Kv4.3 and Kv1 in combination with Kv β 1 were detected. These channels are modulated by the oxidative potential of a cell and could therefore play a role during pathological conditions where mitochondrial function is impaired. In addition, expression of the GIRK channel subunits GIRK-1 and GIRK-4 as well as distinct K_2P channel subunits, that are involved in setting the resting membrane potential of central neurons, was detected.

In the course of the functional characterization of voltage dependent Ca^{2+} channels I utilized RT-PCR expression analyses as well as slice patch clamp recordings in combination with L-type and T-type Ca^{2+} channel blockers. These experiments showed the expression of both Cav1 and Cav3 subtypes in LC neurons mediating a pronounced low-voltage activated Ca^{2+} conductance. Analyzing action potential trains, I revealed that neither L-type nor T-type Ca^{2+} channel antagonism alone leads to a change in firing frequency or action potential properties. However, a combined application of antagonists significantly decreased the afterhyperpolarization, resulting in an increased firing frequency. Hence, I report for the first time the functional expression of T-type Ca^{2+} channels in LC neurons and demonstrate their role in modulating the pacemaking mechanism of LC neurons by working in concert with L-type Ca^{2+} channels. Next to L-type Ca^{2+} channels, T-type Ca^{2+} channels should therefore be taken into account as potential candidates in mediating activity-dependent oxidant stress under pathological conditions.

In the course of the functional characterization of Ca^{2+} activated potassium channels in LC neurons the expression of the SK channel subtypes SK1, SK2 and SK3 was revealed. Using slice patch clamp recordings in combination with the selective SK channel antagonist Apamin and the positive SK channel modulator NS309 I display that SK channels mediate K^{+} outward currents that flow during the afterhyperpolarization of LC neurons. Recordings of spike trains elucidated that inhibition of SK channels leads to decreased afterhyperpolarizations and an increased firing frequency whereas activation of these channels results in augmented afterhyperpolarizations and a decelerated firing frequency. Hence, SK channels can be considered as important regulators of LC neuron pacemaking. Using Calcium Imaging experiments in *in vitro* models of glutamate and rotenone toxicity I revealed that the pharmacological SK channel activation prevents a dysregulation of the intracellular Ca^{2+} homeostasis. Additionally, my patch clamp experiments demonstrated for the first time that acute rotenone exposure induces a significant depolarisation and an increase of firing frequency in LC neurons which could be prevented by SK channel activation. Eventually, stereological analyses showed that SK channel activation via NS309 significantly counteracts the degeneration of LC neurons induced by toxic concentrations of rotenone *in vitro*. Thus, the activation of SK channels is proposed as a promising target to protect LC neurons in early stages of the PD pathology.

1. EINLEITUNG

1.1 Das Locus Coeruleus- Noradrenalin System

1.1.1 Funktionelle Anatomie des Locus Coeruleus

Der Locus Coeruleus (LC) ist eine dichte Ansammlung vorwiegend noradrenerger Neurone, die bilateral im rostralen pontinen Tegmentum an der ventrolateralen Begrenzung des vierten Ventrikels liegen (Benarroch, 2009, Foote *et al.*, 1983). Die Benennung des LC beruht auf der Einlagerung des Pigments Neuromelanin, welches das Kerngebiet in Hirnschnitt-Präparationen bläulich gefärbt erscheinen lässt (lateinisch *locus* „Ort“ und *coeruleus* „himmelblau“) (Szabadi, 2013). Die Zellzahl innerhalb des LC variiert speziesabhängig und liegt in der Maus bei etwa 2000 (O'Neil *et al.*, 2007) und im Menschen im Bereich von 50000 bis 60000 Neuronen (Sharma *et al.*, 2010, Baker *et al.*, 1989). Peripher wird der LC durch den Locus Subcoeruleus begrenzt, welcher eine geringere Neuronendichte aufweist und neben Noradrenalin synthetisierenden Zellen auch GABAerge Interneurone beherbergt (Foote *et al.*, 1983, Aston-Jones *et al.*, 2004). Von den sieben bekannten noradrenergen Nuclei des Hirnstamms umfasst der LC die meisten Neurone und stellt somit die wichtigste Noradrenalin-Quelle des Gehirns dar (Szabadi, 2013). Die efferenten Projektionen des LC können in drei Leitungsbahnen eingeteilt werden, eine dorsale aufsteigende, eine zerebelläre sowie eine absteigende Bahn (Abbildung 1.1). Die dorsale aufsteigende Bahn innerviert nahezu sämtliche Strukturen des Mittelhirns (das periaquäduktale Grau, die Raphekerne und viele mehr), den Thalamus, das limbische System einschließlich des Hippokampus und der Amygdala sowie den gesamten Neokortex (Jones *et al.*, 1977, Jones und Yang, 1985, Benarroch, 2009). Des Weiteren wurden Projektionen zur Substantia Nigra pars compacta (SNpc) als Teil der Basalganglien postuliert (Collingridge *et al.*, 1979).

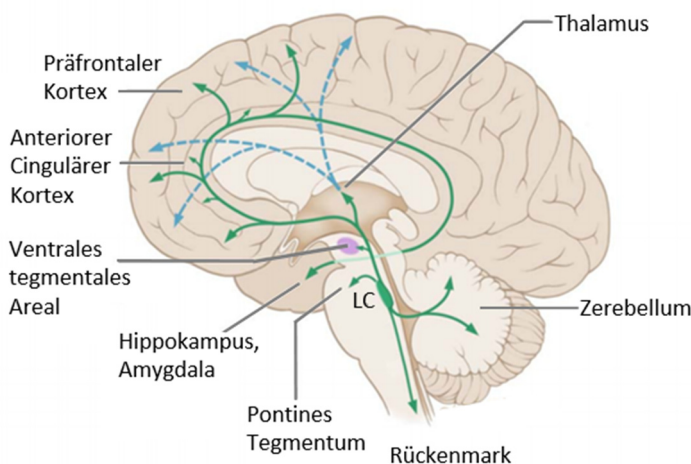


Abbildung 1.1: Organisation des Locus Coeruleus- Noradrenalin Systems.

Die noradrenergen Neurone des Locus Coeruleus (LC) liegen bilateral im pontinen Tegmentum. LC Neurone projizieren in viele verschiedene Hirnregionen, wobei eine dorsale aufsteigende, eine zerebelläre sowie eine absteigende Bahn unterschieden werden können. Der LC ist der größte noradrenerge Nucleus des Hirnstamms und stellt die wichtigste Noradrenalin-Quelle des Kortex, des Hippokampus und des Zerebellums dar. Abbildung modifiziert nach Espay *et al.*, 2014.

Die zerebelläre Bahn verläuft im Pedunculus cerebellaris superior und innerviert sowohl die Nuclei als auch den Kortex des Kleinhirns (Jones und Yang, 1985). Die Kollateralen der absteigenden LC Fasern projizieren zu den motorischen Kernen des unteren Hirnstamms und des Rückenmarks (Szabadi, 2013). Ein Charakteristikum coeruleärer Neurone ist die ausgeprägte Divergenz ihrer Kollateralen, so dass ein einzelnes Neuron verschiedene Hirnregionen simultan aktivieren kann (Nagai *et al.*, 1981). Die afferente Innervation des LC erfolgt vornehmlich in reziproker Weise, also ausgehend von denjenigen Hirnregionen, die ihrerseits Projektionen des LC erhalten (Aston-Jones *et al.*, 1991). Die wichtigsten exzitatorischen Eingänge erhält der LC durch glutamaterge Projektionen des Neokortex, orexinerge Afferenzen des Hypothalamus, dopaminerge Afferenzen des periaquäduktalen Graus und des ventralen tegmental Arealen sowie durch cholinerge Projektionen tegmentaler Nuclei (Jodo *et al.*, 1998, Aston-Jones *et al.*, 1991). Des Weiteren wird der Aktivitätsgrad des LC über die Freisetzung der Neurotransmitter Histamin (aus den Nuclei Tuberomammillaris) und Serotonin (aus den dorsalen Raphe-kernen) erhöht (Szabadi, 2013). Die dominantesten inhibitorischen Afferenzen des LC sind GABAerg oder enkephalinerg und entstammen dem Hypothalamus sowie diverser Nuclei der Medulla Oblongata. Über inhibitorische adrenerge Autorezeptoren erfolgt darüber hinaus eine Selbstregulation (Ennis und Aston-Jones, 1989, Aston-Jones *et al.*, 1991). Die generell vigilanzsteigernde Funktion des LC auf den Organismus wird über den Neurotransmitter Noradrenalin vermittelt. Während der Synthese des Noradrenalins innerhalb der coeruleären Neurone entsteht zunächst, katalysiert durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH), L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) aus Tyrosin, welches anschließend zu Dopamin umgewandelt wird. Innerhalb synaptischer Vesikel wird dann die Umwandlung von Dopamin zu Noradrenalin durch das Enzym Dopamin-beta-Hydroxylase (DBH) katalysiert (Benarroch, 2009) (Abbildung 1.2). Die Freisetzung des Noradrenalins erfolgt auf zwei unterschiedliche Weisen, die als „neurokrin“ einerseits und „parakrin“ andererseits beschrieben werden können (Szabadi, 2013).

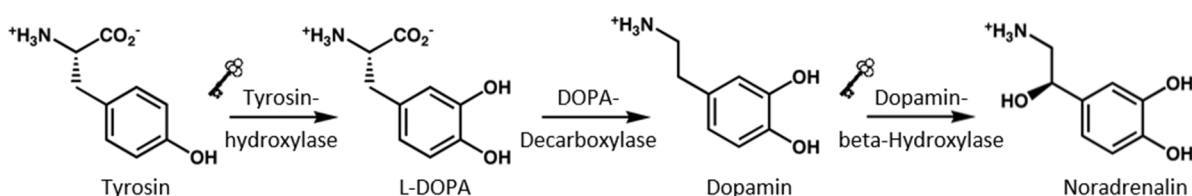


Abbildung 1.2: Synthese des Neurotransmitters Noradrenalin.

Der erste Schritt der Noradrenalin-Biosynthese ist die Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin am C3-Atom durch das Schlüsselenzym der Dopamin-Synthese Tyrosinhydroxylase. Das so entstandene L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) wird dann durch das Enzym DOPA-Decarboxylase zum biogenen Amin Dopamin decarboxyliert. Durch die Hydroxylierung der Seitenkette mit Hilfe des Schlüsselenzyms der Noradrenalin-Synthese Dopamin-beta-Hydroxylase entsteht schließlich Noradrenalin.

Die neurokrine Sekretion erfolgt an synaptischen Endigungen und vermittelt einen direkten Effekt auf Ziel-Neurone. Bei der parakrinen Sekretion wird das Noradrenalin hingegen an axonalen Varikositäten ohne direkten synaptischen Kontakt freigesetzt. Die Wirkung ist in diesem Fall diffuser und erreicht neben Neuronen außerdem Glia-Zellen und Hirn-Gefäße (Harik und McGunigal, 1984, Bekar *et al.*, 2008). Nach Freisetzung des Noradrenalins kann dieses an G-Protein-gekoppelte α_1 -, α_2 - und β -Rezeptoren binden. Während α_1 - und β -Rezeptoren generell an der Postsynapse lokalisiert sind und eine exzitatorische Wirkung auf zentrale Neurone vermitteln, befinden sich α_2 -Rezeptoren sowohl prä- als auch postsynaptisch. Die Aktivierung von α_2 -Rezeptoren wirkt bei somato-dendritischer Lokalisation inhibitorisch auf das Zielneuron oder präsynaptisch als Autorezeptor auf die Noradrenalin-Ausschüttung selbst (Bloom, 1979, Waterhouse *et al.*, 1998). Zur Inaktivierung des Noradrenalins wird es mittels eines selektiven Noradrenalin-Transporters aus dem synaptischen Spalt entfernt, zurück in die Präsynapse transportiert und dort erneut in synaptischen Vesikeln gespeichert (Szabadi, 2013).

1.1.2 Physiologie coeruleärer Neurone

Die Aktivität des LC korreliert eng mit dem Aufmerksamkeits-Level des Organismus und kann in die beiden Modi „phasisch“ und „tonisch“ eingeteilt werden. Während der Ausführung von Aufgaben, die eine fokussierte Aufmerksamkeit verlangen, steht die phasische Aktivität im Vordergrund. Die Reaktion auf bestimmte Stimuli korreliert in diesem Fall mit *bursts* von Aktionspotenzialen (APs), das tonische Aktivitätslevel ist hingegen eher moderat. Es wird postuliert, dass diese phasische Aktivität als temporärer Aufmerksamkeitsfilter dient, der für die Aufgabe relevante Verhaltensmuster selektiv fördert (Aston-Jones und Cohen, 2005, Sara, 2009). Die tonische Aktivität der LC Neurone ist durch das Auftreten von APs mit überaus regelmäßiger Frequenz gekennzeichnet. Als Reaktion auf Stress oder während Phasen erhöhter, aber unfokussierter Wachsamkeit kommt es zu einer Steigerung der tonischen AP-Frequenz (Gompf *et al.*, 2010, Takahashi *et al.*, 2010). Während Phasen geringer Aufmerksamkeit ist die tonische Aktivität der LC Neurone hingegen reduziert und kommt während bestimmter Schlafphasen sogar komplett zum Erliegen (Foote *et al.*, 1980, Aston-Jones und Cohen, 2005). LC Neurone sind elektrotonisch über *Gap Junctions* gekoppelt, wodurch eine synchrone, großflächige Noradrenalinausschüttung gewährleistet wird (Ballantyne *et al.*, 2004, Ishimatsu und Williams, 1996). Der tonischen Aktivität des LC unterliegt die Fähigkeit coeruleärer Neurone intrinsisch APs zu generieren. Dieser intrinsische Schrittmachermechanismus wurde in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien nachgewiesen (Foote *et al.*, 1980, Williams *et al.*, 1984, Alreja und Aghajanian, 1991). Über diverse Einflüsse wie exzitatorische und inhibitorische Neurotransmitter oder den pH-Wert wird die Schrittmacherfrequenz der LC Neurone moduliert (Alreja und Aghajanian, 1991, D'Adamo *et al.*, 2011, Murai und Akaike, 2005). In Studien, die vornehmlich in der Ratte durchgeführt wurden, konnten

unterschiedliche Leitfähigkeiten, die Einwärts- und Auswärtsströme vermitteln, beschrieben werden. Mittels elektrophysiologischer Messmethoden wurden K^+ Auswärtsströme identifiziert, die einen transienten K^+ (I_A) (Forsythe *et al.*, 1992, Williams *et al.*, 1984), einen persistierenden K^+ (I_K) (Murai und Akaike, 2005, Matschke, 2011), einen Ca^{2+} aktivierten K^+ (I_{SK}/I_{BK}) (Osmanović und Shefner, 1993, Murai *et al.*, 1997), einen ATP abhängigen K^+ (I_{KATP}) (Nieber *et al.*, 1995) und einen einwärtsgerichtenden K^+ (I_{Kir}) umfassen (Zhang *et al.*, 2010). Die molekulare Identität der Ionenkanäle, die diese Ströme vermitteln, ist jedoch weitestgehend unbekannt. Bisher beschriebene Einwärtsströme umfassen einen Tetrodotoxin (TTX)-sensitiven und -insensitiven Na^+ (I_{Na}), einen unspezifischen Kationenstrom sowie L-, N-, P- und Q-Typ vermittelte Ca^{2+} Ströme (Chieng und Bekkers, 1999, Murai und Akaike, 2005, van den Pol *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2010, Filosa und Putnam, 2003b). Die Kombination welcher Leitfähigkeiten dem Schrittmachermechanismus von LC Neuronen unterliegt konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Postuliert wurde, dass die spontane Depolarisation muriner LC Neurone vorwiegend durch die Kombination eines TTX-sensitiven Na^+ Stromes und eines TEA-sensitiven K^+ Stromes vermittelt wird (de Oliveira *et al.*, 2010).

1.1.3 Funktionen des LC- Noradrenalin Systems

Aufgrund seiner ausgedehnten Projektionen ist der LC an der Regulation von kortikalen, subkortikalen, Hirnstamm- und Rückenmarks-Netzwerken beteiligt. Eine der am intensivsten studierten Funktionen des LC-Noradrenalin Systems ist die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus und des damit einhergehenden Vigilanz-Levels. Der LC übernimmt innerhalb dieses Systems mehrere vigilanzsteigernde Aufgaben. Einerseits vermitteln die kortikalen Projektionen einen direkten alarmierenden Effekt, andererseits werden weitere vigilanzsteigernde Hirnareale (Thalamus, tegmentale Nuclei) über exzitatorische Projektionen des LC rekrutiert. Zusätzlich erhält auch der LC selbst exzitatorische Eingänge von anderen vigilanzsteigernden Nuclei des Hirnstammes und des Hypothalamus (Szabadi, 2013). Schließlich unterdrückt der LC mittels inhibitorischer Projektionen die Aktivität schlaf-fördernder Hirnareale des pontinen Tegmentums und verhindert so insbesondere das Einsetzen des *Rapid eye movement* (REM-) Schlafs (Fuller *et al.*, 2007). Neben der generellen Vigilanzsteigerung vermittelt der LC jedoch auch die Fähigkeit zur fokussierten Aufmerksamkeit. Über die koordinierte Interaktion mit Netzwerken des Frontalhirns wird die ständige Möglichkeit zur Reorientierung als Antwort auf sich verändernde Bedingungen gewährleistet. Auf diese Weise fungiert der LC also als wichtiger Regulator kognitiver Prozesse (Aston-Jones und Cohen, 2005, Usher *et al.*, 1999, Janitzky *et al.*, 2015). Das LC-Noradrenalin System wird des Weiteren durch endogene und exogene Stressoren, wie Schmerz, Zytokin-Ausschüttung und sozialen Stress, aktiviert und ist an der Konsolidierung des emotionalen Gedächtnisses beteiligt (Valentino und Van Bockstaele, 2008, Berridge und Waterhouse, 2003). Über

die Modulation der Aktivität anderer Nuclei des sympathischen vegetativen Nervensystems und des Hypothalamus ist das LC-Noradrenalin System an der Kontrolle vielfältiger autonomer Körperfunktionen beteiligt. Eine Aktivierung des LC führt generell zu einem gesteigerten Sympathikotonus mit typischen Zeichen wie der Pupillendilatation und einer gesteigerten Herzfrequenz (Szabadi, 2013). Aufgrund der pH-Empfindlichkeit coerulärer Neurone fungiert der LC außerdem im Zusammenspiel mit dem Prä-Bötzinger Komplex der Medulla als zentraler Chemosensor (Smith *et al.*, 1991, Oyamada *et al.*, 1998).

1.1.3.1 Klinische Korrelationen

Das breite Aufgabenspektrum des LC spiegelt sich auch in einer Vielzahl von Pathologien wieder, während derer es zu Störungen des LC-Noradrenalin Systems kommt. Diese Pathologien umfassen chronische neurodegenerative Prozesse, akute vaskuläre Schäden sowie psychiatrische Erkrankungen. Eine progressive Neurodegeneration der noradrenergen LC Neurone wurde sowohl bei Synucleinopathien wie der Parkinson Erkrankung (PD) (Gesi *et al.*, 2000) und der Lewy-Körper Demenz (Puschmann *et al.*, 2012) als auch bei Tauopathien (Morbus Alzheimer) beschrieben (Heneka *et al.*, 2006). Im Falle aller drei Erkrankungen findet die Degeneration der LC Neurone zu einem frühen Zeitpunkt der Pathogenese statt und bedingt viele der charakteristischen klinischen Symptome. Der Verlust coerulärer Neurone während des Morbus Alzheimer wird maßgeblich für die bei dieser Erkrankung auftretenden kognitiven Veränderungen und die oftmals auftretende Depression verantwortlich gemacht (Heneka *et al.*, 2006). Auf die Rolle des LC während der Pathogenese der PD wird in Abschnitt 1.4 genauer eingegangen. Ein Zellverlust noradrenerger LC Neurone wurde auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, darunter das Down Syndrom (German *et al.*, 1992) und die Pick-Krankheit (Arima und Akashi, 1990, Irwin *et al.*, 2015) sowie bei Multipler Sklerose dokumentiert (Niepel *et al.*, 2013). Läsionen des LC, beispielsweise durch Hirninfarkte im Bereich des pontinen Tegmentums, resultieren in Narkolepsie und Störungen der REM-Schlaf Phase (REM-Schlaf Verhaltensstörung, RBD) (Mathis *et al.*, 2007) bis hin zum Hirnstamm-Koma (Parvizi und Damasio, 2003). Veränderungen des LC-Noradrenalin Systems stehen des Weiteren im Zusammenhang mit zahlreichen psychiatrischen Störungen. Aufgrund der exzitatorischen Projektionen zum limbischen System, insbesondere zu den Nuclei der Amygdala, kann eine Überaktivität coerulärer Neurone die Grundlage für Angst- und Panikstörungen darstellen (Szabadi, 2013). Weitere psychiatrische Erkrankungen, bei denen Veränderungen des LC beschrieben wurden, umfassen die Depression, die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), die Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS), Bipolare Störungen, die Schizophrenie sowie Mechanismen der Opioid Abhängigkeit und des Entzugs (Benarroch, 2009).

1.2 Die Familie der spannungsgesteuerten Ca^{2+} Kanäle (Cav)

Cav Kanäle sind multimere, membranständige Proteinkomplexe, die bei Depolarisation der Zellmembran einen Influx von Calcium-Ionen vermitteln. Über die Kopplung an intrazelluläre Signalwege fungieren Cav Kanäle als wichtige Regulatoren zahlreicher zellulärer Prozesse wie Sekretion, Kontraktion, Genexpression und Neurotransmission (Catterall *et al.*, 2003).

1.2.1 Aufbau und Funktion der Cav Kanäle

Der Cav Proteinkomplex besteht aus einer zentralen Kanal-formenden α_1 Untereinheit und drei bis vier akzessorischen β -, $\alpha_2\delta$ - oder γ -Untereinheiten, die von multiplen Genen kodiert werden (Birnbaumer *et al.*, 1994). Die α_1 Untereinheit der Cav Kanäle besteht aus vier homologen Domänen (I-IV) mit jeweils sechs Transmembrandomänen (S1-S6). Das S4 Segment fungiert mittels positiv geladener Aminosäurereste als Spannungssensor, während die S5 und S6 Segmente die Porenschleife bilden und so die Leitfähigkeit und Selektivität für Ca^{2+} bestimmen. Die α_1 Untereinheit beinhaltet des Weiteren alle bisher beschriebenen Bindungsstellen zur Regulation durch sekundäre Botenstoffe, Pharmaka und Toxine (Catterall *et al.*, 2003). Eine erste Einteilung der Cav Kanäle wurde anhand ihrer grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften vorgenommen. Cav Kanäle, die nur eine geringe Depolarisation zur Aktivierung benötigen, wurden als *low-voltage-activated* (LVA-) Kanäle, solche die einen relativ großen Spannungssprung zur Aktivierung benötigen als *high-voltage-activated* (HVA-) Kanäle bezeichnet (Hagiwara *et al.*, 1975). Da zahlreiche Gene für verschiedene α_1 Untereinheiten kodieren, wurde eine erste einheitliche Nomenklatur im Jahre 1994 eingeführt. Hierbei wurden die α_1 Untereinheiten als α_{1S} (aufgrund der Erstbeschreibung im Skelettmuskel) und die im Folgenden beschriebenen als α_{1A} bis α_{1E} benannt (Birnbaumer *et al.*, 1994). Die für die jeweiligen α_1 -Untereinheiten kodierenden Gene wurden in der Reihenfolge ihrer erstmaligen Klonierung mit Großbuchstaben benannt (CACNA1A-CACNA1I). Aufgrund der Erstbeschreibung in der Skelettmuskulatur bildet das für Cav1.1 kodierende Gen auch hier eine Ausnahme und wurde mit CACNA1S benannt (Lory *et al.*, 1997). Im Jahre 2000 wurde die Nomenklatur der Cav Kanäle an die der spannungsabhängigen K^+ Kanäle (Kv) angepasst. Demnach erfolgt die Einteilung nun anhand der Sequenzhomologie der Untereinheiten in die drei Subfamilien Cav1, Cav2 und Cav3 (Ertel *et al.*, 2000). Eine weitere Einteilung der Cav Kanäle erfolgt anhand der charakteristischen physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Ströme, die sie vermitteln oder anhand des primären Expressionsgewebes. Mitglieder der Cav1 Subfamilie werden aufgrund ihrer Eigenschaft persistierende Ströme zu vermitteln als L-Typ Ca^{2+} Kanäle (für engl. *long lasting*) bezeichnet. Die Mitglieder der Cav2 Subfamilie werden hingegen aufgrund ihrer postulierten gewebsspezifischen

Expression als P/Q-Typ (für engl. *purkinje cells*), N-Typ (für engl. *neuronal*) oder aufgrund der Resistenz gegenüber Toxinen als R-Typ (für engl. *resistant*) benannt. Da die Kanäle der Cav3 Subfamilie Ströme mit vergleichsweise geringer Amplitude vermitteln, werden diese auch als T-Typ Ca^{2+} Kanäle (für engl. *tiny*) bezeichnet (Tsien *et al.*, 1995) (Abbildung 1.3).

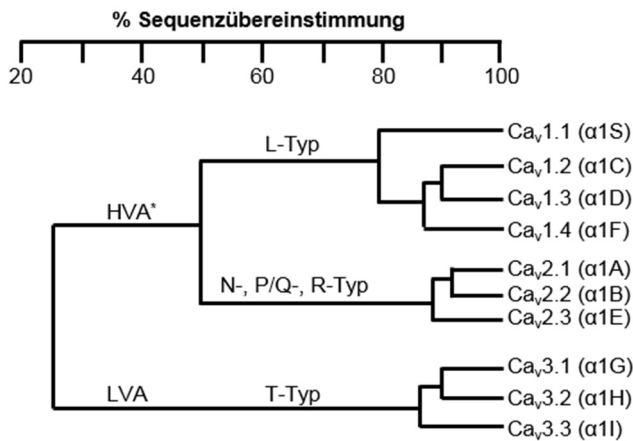


Abbildung 1.3: Phylogenetische Einteilung der Cav Kanäle.

Cav Kanäle werden anhand der Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz in die drei Subfamilien Cav1, Cav2 und Cav3 eingeteilt. Weitere Einteilungen erfolgen anhand der Spannungsabhängigkeit in *high-voltage-activated* (HVA) und *low-voltage-activated* (LVA). Sowie in die Typen L- („long-lasting“), P/Q- („purkinje“), N- („neuronal“), R- („resistant“) und T- („tiny“). Die α1 Untereinheiten wurden in der Reihenfolge ihrer Beschreibung mit α1A bis α1E benannt. Eine Ausnahme bildet die α1 Untereinheit des Cav1.1 Kanals, welche aufgrund der Erstbeschreibung im Skelettmuskel als α1S bezeichnet wird.

1.2.2 L-Typ Ca^{2+} Kanäle

Im humanen Genom kodieren vier Cav1 Gene für L-Typ Ca^{2+} Kanäle, welche als Cav1.1 - Cav1.4 bezeichnet werden (Flucher und Franzini-Armstrong, 1996) (Abbildung 1.3). Während die Expression von Cav1.1 und Cav1.4 auf die Skelettmuskulatur, beziehungsweise auf die Retina begrenzt ist, sind Cav1.2 und Cav1.3 in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert. Dokumentiert wurde die Expression von Cav1.2 und/oder Cav1.3 in ventrikulären Herzmyozyten, glatten Muskelzellen, neuroendokrinen Zellen des Nebennierenmarks und des Pankreas, Sinneszellen der Retina und Cochlea, Fibroblasten sowie in Neuronen (Lipscombe *et al.*, 2004). Im zentralen Nervensystem (ZNS) zeigt Cav1.2 eine nahezu ubiquitäre Expression, während Cav1.3 vor allem in Bereichen des limbischen Systems, des Hypothalamus und des Hirnstammes exprimiert ist (Hetzenauer *et al.*, 2006). Neuronal fungieren sowohl Cav1.2 als auch Cav1.3 als Regulatoren der Neurotransmitter- und Hormon-Freisetzung, der Genexpression und der elektrischen Aktivität. Die individuellen Funktionen dieser Kanäle konnten mittels der Generierung Cav1.2 und Cav1.3 defizienter Maus-Linien in jüngeren Studien aufgeklärt werden. Während die isolierte Aktivierung des Cav1.2 Kanals vor allem die hippocampale Langzeit-Potenzierung und Hippokampus abhängige Formen des Gedächtnisses beeinflusst, hat die isolierte Cav1.3 Kanal Aktivierung vor allem Auswirkungen auf die Integration von emotions-assoziiertem Verhalten (Striessnig *et al.*, 2006).

Historisch wurden L-Typ Ca^{2+} -Kanäle anhand fünf verschiedener Eigenschaften von anderen Cav Kanälen unterschieden: 1) der Aktivierung bei ausgeprägter Membrandepolarisation, 2) der langsamen Aktivierungskinetik, 3) der sowohl Ca^{2+} - als auch spannungsabhängigen Inaktivierung, 4) der großen Einzelkanal-Leitfähigkeit und 5) der hohen Sensitivität gegenüber Dihydropyridin-(DHP-) Agonisten und Antagonisten. Studien des letzten Jahrzehntes unterstreichen jedoch die Heterogenität der L-Typ Ca^{2+} Kanäle und lassen daher die strikte Einordnung nach obigem Schema nicht mehr zu (Lipscombe *et al.*, 2004). Diesbezüglich wurde auch gezeigt, dass der Cav1.2 Kanal auf komplexe Weise, vor allem durch alternatives Spleißen, genetisch reguliert wird. Hierdurch entsteht eine Vielfalt an Kanal-Subtypen, die unterschiedliche elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften aufweisen können (Perez-Reyes *et al.*, 1990).

Auch die individuellen Funktionen der Cav1.2 und Cav1.3 Kanal-Untereinheiten können auf ihre unterschiedlichen elektrophysiologischen Charakteristika zurückgeführt werden. Zahlreiche Studien in unterschiedlichen Modellsystemen dokumentieren, dass L-Typ Ca^{2+} Kanäle, die Cav1.3 Untereinheiten beinhalten, einen um 20-25 mV niedrigeren Aktivierungsschwellenwert haben als Cav1.2 Kanäle. Während die Aktivierung der Cav1.2 Kanäle ab einem Membranpotenzial von etwa -30 mV beginnt, aktivieren Cav1.3 Kanäle bereits im Bereich von -55 mV (Abbildung 1.4) (Koschak *et al.*, 2001; Scholze *et al.*, 2001; Xu und Lipscombe 2001).

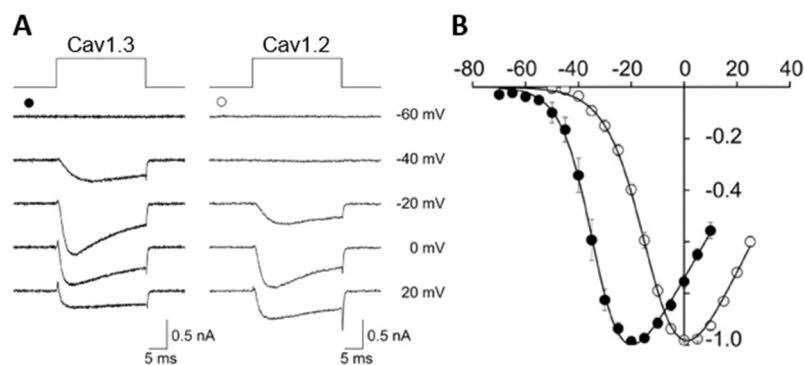


Abbildung 1.4: Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsschwellenwerte von Cav1.2 und Cav1.3 Kanälen.

Abbildung (A) zeigt die Stromantworten von tsA201 Zellen, die Cav1.3 (●) oder Cav1.2 (○) exprimieren, auf Spannungssprünge zu den angegebenen Potenzialen. Während Cav1.3 Kanäle schon bei einer Depolarisation auf -40 mV einen Ca^{2+} Influx vermitteln, aktivieren Cav1.2 Kanäle erst ab einem Membranpotenzial von -20 mV. Die Strom-Spannungsbeziehungen in (B) verdeutlichen die Verschiebung der Aktivierung von Cav1.3 Kanälen zu hyperpolarisierten Membranpotenzialen im Vergleich zu Cav1.2 Kanälen. Abbildung modifiziert nach Lipscombe *et al.*, 2004.

Diese Aktivierung bei relativ hyperpolarisierten Membranpotenzialen ist die Voraussetzung dafür, dass Cav1.3 Kanäle in erregbaren, neuronalen Zellen für die Generierung von Calcium-Oszillationen verantwortlich sind (Giráldez *et al.*, 2002; Pennartz *et al.*, 2002). In dopaminergen Neuronen der SNpc sind diese Ca^{2+} Oszillationen Teil des intrinsischen Schrittmachermechanismus (Guzman *et al.*, 2009). Cav1.2 Kanäle tragen hingegen dazu bei die Form eines Aktionspotenzials zu definieren und koppeln die Membrandepolarisation an die Regulation der Genexpression (Lipscombe *et al.*, 2004).

1.2.2.2 Pharmakologie der L-Typ Ca^{2+} Kanäle

Liganden der L-Typ Ca^{2+} Kanäle bilden eine Gruppe von Substanzen, die sowohl experimentell als auch therapeutisch von großem Nutzen sind. Die wichtigsten dieser Substanz-Gruppen sind organische Blocker, welche die DHPs, Phenylalkylamine und Benzothiazepine einschließen (Lacinová, 2005). DHP-Derivate sind einerseits klinisch in der Behandlung des Bluthochdruckes von Bedeutung (Epstein *et al.*, 2007) und andererseits experimentell zur Identifikation von Ca^{2+} Kanälen der Cav1 Familie. Anhand von Studien des Skelettmuskel Cav1.1 Kanals wurde die DHP-Bindungsstelle an Aminosäureresten der Transmembrandomänen I, III und IV der α_1 Untereinheit identifiziert (Hockerman *et al.*, 1997, Kalasz *et al.*, 1993). DHPs wirken als allosterische Kanal-Modulatoren, deren Affinität sowohl spannungsabhängig (Bean, 1984, Kokubun *et al.*, 1986) als auch calciumabhängig (Schneider *et al.*, 1991) ist. Ito *et al.* beschreiben für die Cav1.2 Variante glatter Muskelzellen eine halbmaximale Inhibition des Ca^{2+} Stromes (IC_{50}) bei einer Konzentration von etwa 12 nM des DHP-Derivates Isradipin (Ito *et al.*, 1997). Andere, durch alternatives Spleißen entstandene, Kanal-Varianten können in ihrer Isradipin-Sensitivität jedoch bis zu zehnfach von diesem Wert abweichen (Abernethy und Soldatov, 2002). Kontroverse Ergebnisse wurden im Hinblick auf die Subtyp-Sensitivität des Isradipins für Cav1.2 und Cav1.3 Kanäle erzielt. Während Scholze *et al.* keine Unterschiede zwischen diesen Kanal-Untereinheiten feststellen konnten, dokumentieren zwei weitere Studien eine höhere Sensitivität für Cav1.2 im Vergleich zu Cav1.3 (Scholze *et al.*, 2001, Koschak *et al.*, 2001, Xu und Lipscombe, 2001).

1.2.3 T-Typ Ca^{2+} Kanäle

Ca^{2+} Ströme, die schon bei einer schwachen Membrandepolarisation aktivieren, wurden erstmalig bereits in den 1980er Jahren in Neuronen der unteren Olive und des Thalamus beschrieben (Llinás und Yarom, 1981, Jahnsen und Llinás, 1984). Später wurden die Ionenkanäle, die diesen LVA Strom vermitteln, aufgrund ihrer geringen Einzelkanalleitfähigkeit von 5-9 pS als T-Typ Ca^{2+} Kanäle bezeichnet (Lacinová, 2005). Im humanen Genom kodieren drei Gene für die T-Typ Ca^{2+} Kanal Untereinheiten Cav3.1, Cav3.2 und Cav3.3 (Abbildung 1.3). Zunächst erfolgte die Klonierung des für Cav3.1 kodierenden Gens, CACNA1G, (Perez-Reyes, 1998) und anschließend die der Gene CACNA1H (Cav3.2) (Cribbs *et al.*, 1998) und CACNA1I (Cav3.3) (Lee *et al.*, 1999). Durch die genetische Regulation mittels des alternativen Spleißings entstehen eine Vielzahl weiterer Kanal-Subtypen (Lambert *et al.*, 2014). Die Expression von T-Typ Ca^{2+} Kanälen wurde in vielen unterschiedlichen Geweben dokumentiert, darunter das Herz, Spinalganglien, die Nebenniere und Neurone des ZNS (Lacinová, 2005). Die drei T-Typ Ca^{2+} Kanal Subtypen teilen grundlegende elektrophysiologische Charakteristika, welche einen niedrigen Aktivierungsschwellenwert, eine transiente Aktivierung und die Inaktivierung in ähnlichen Spannungsbereichen wie die Aktivierung (*window current*) umfassen. Die leicht abweichenden Funktionen der einzelnen Cav3-Subtypen sind auf geringfügige Unterschiede der Kinetiken und der Spannungsabhängigkeiten der Aktivierung und Inaktivierung zurückzuführen. So aktivieren Kanäle, welche die Cav3.3 Untereinheit beinhalten, bei etwa um 10 mV depolarisierteren Membranpotenzialen als Cav3.1 und Cav3.2 (Chemin *et al.*, 2002).

Die Funktion der T-Typ Ca^{2+} Kanäle in zentralen Neuronen hängt vom Ruhemembranpotenzial des jeweiligen Neuronentyps, der Kanal-Dichte an der Zellmembran und der Kombination der Cav3 Untereinheiten ab (Broicher *et al.*, 2007, Becker *et al.*, 2008). Eine schon früh beschriebene Funktion der T-Typ Ca^{2+} Kanäle ist die Generierung von Membran-Oszillationen (*low threshold spikes*, LTS), welche die Grundlage für die phasische (*burst*-) Aktivität verschiedener zentraler Neurone darstellt. Die Voraussetzung für die Entstehung der LTS ist ein hyperpolarisiertes Membranpotenzial, welches die Aktivierbarkeit der Cav3 Kanäle gewährleistet (Lambert *et al.*, 2014). Ist das Ruhemembranpotenzial der Zelle hingegen instabil, werden die Kanäle nur kurzfristig aktivierbar und als Resultat werden langsame Calcium-Oszillationen mit einzelnen aufgelagerten Aktionspotenzialen beobachtet (Cain und Snutch, 2010). Die höchste Dichte an T-Typ Ca^{2+} Kanälen findet sich in den Dendriten und synaptischen Endigungen zentraler Neurone. In Dendriten kann der durch diese Kanäle vermittelte Ca^{2+} Influx als Verstärker exzitatorischer postsynaptischer Potenziale fungieren (Magee *et al.*, 1995), an synaptischen Endigungen trägt er zur Freisetzung von Neurotransmittern bei (Huang *et al.*, 2011). Eine wachsende Anzahl von Studien dokumentiert des Weiteren, dass T-Typ Ca^{2+} Kanäle auch die tonische Aktivität zentraler Neurone modulieren können, obwohl dieses Entladungsmuster

generell von depolarisierteren Membranpotenzialen ausgeht (Deleuze *et al.*, 2012, Lambert *et al.*, 2014).

1.2.3.1 Pharmakologie der T-Typ Ca^{2+} Kanäle

T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelte Ströme werden durch anorganische divalente und trivalente Kationen wie Ni^{2+} , Cd^{2+} und Y^{3+} antagonisiert (Lacinová, 2005). Aufgrund ihrer unspezifischen Wirkung auf weitere Ionenkanäle werden diese Kationen jedoch mittlerweile zur experimentellen Isolation von Cav3 Kanälen vernachlässigt. Das Phenylalkylamin-Derivat Mibefradil, welches präferentiell T-Typ Ca^{2+} Kanäle blockiert, wurde in den 90er Jahren als antihypertensives Pharmakon vermarktet, aufgrund auftretender Nebenwirkungen jedoch wieder zurückgezogen (Lory und Chemin, 2007). Die Inhibition von T-Typ Ca^{2+} Kanälen ist spannungsabhängig und zeigt eine höhere Affinität bei depolarisierten Membranpotenzialen (Laurangier *et al.*, 2001). Der IC_{50} Wert für die Cav3 Kanal Inhibition durch Mibefradil liegt sowohl für Ca^{2+} als auch für Ba^{2+} getragene Ströme im Bereich von 200 nM (Klugbauer *et al.*, 1999). Es wurde dokumentiert, dass Mibefradil auch L-Typ Ca^{2+} Kanäle sowie ATP sensitive K^{+} Kanäle blockiert (Gomora *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 1999). Der IC_{50} von Mibefradil für T-Typ Ca^{2+} Kanäle ist jedoch zwölffach geringer als für L-Typ Ca^{2+} Kanäle (Martin *et al.*, 2000). In jüngerer Zeit gelang schließlich die Synthese mehrerer selektiver T-Typ Ca^{2+} Kanal Antagonisten, darunter das Piperidin-Derivat TTA-P2 (Shipe *et al.*, 2008) sowie die Glycinamide Z941 und Z944 (Tringham *et al.*, 2012), welche alle Cav3 Subtypen mit einem IC_{50} Wert im nanomolaren Bereich inhibieren.

1.2.4 Die Rolle der Cav Kanäle in LC Neuronen

Obwohl zahlreiche Studien zeigen, dass Ca^{2+} Kanäle mit niedrigem Aktivierungsschwellenwert (Cav1.3 sowie die Mitglieder der Cav3 Familie) den Schrittmachermechanismus verschiedener zentraler Neurone regulieren (Deleuze *et al.*, 2012, Guzman *et al.*, 2009, Wolfart und Roeper, 2002), wurde der Einfluss dieser Ionenkanäle auf die Spontanaktivität coeruleärer Neurone bisher nur unzureichend analysiert. In einer einzelnen frühen Studie an dissoziierten LC Neuronen der Ratte dokumentieren Chieng und Bekkers die Isolation von Ba^{2+} Strom Komponenten, die von L-, N- und P/Q/R-Typ Ca^{2+} Kanälen vermittelt werden (Chieng und Bekkers, 1999). Eine weitere Studie berichtet die Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} Kanälen als Bestandteil des Mechanismus zur Chemosensation im LC der Ratte (Filosa und Putnam, 2003a). In einer jüngeren Studie von Sanchez-Padilla *et al.* konnte die Expression der L-Typ Ca^{2+} Kanal Untereinheit Cav1.3 in murinen LC Neuronen nachgewiesen werden. Obwohl der Cav1.3 vermittelte Ca^{2+} Influx hier zeitgleich zu den intrinsisch generierten APs auftrat, konnte kein direkter

Einfluss auf die Schrittmacherfrequenz der LC Neurone festgestellt werden (Sanchez-Padilla *et al.*, 2014).

In meiner Diplomarbeit konnte ich anhand elektrophysiologischer Messungen im akuten Hirnschnitt zeigen, dass murine LC Neurone eine Ca^{2+} Leitfähigkeit aufweisen, die schon bei einem hyperpolarisierten Membranpotenzial von -60 mV aktiviert. Bei einem Membranpotenzial von -74 mV ($V_{1/2 \text{ Inakt.}}$) waren die Kanäle, die dieser Leitfähigkeit unterliegen, bereits halbmaximal inaktiviert (Abbildung 1.5) (Matschke *et al.*, 2015, Matschke, 2011). Obwohl diese Experimente nicht entworfen wurden um spezifische Ca^{2+} Kanal vermittelte Stromkomponenten zu isolieren, deuteten die vorläufigen Ergebnisse daraufhin, dass LVA Kanäle der Cav1 und Cav3 Familie funktionell in LC Neuronen exprimiert sein könnten.

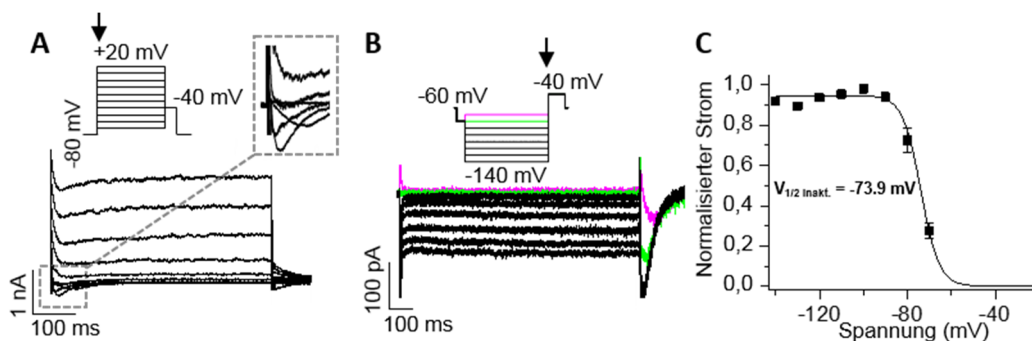


Abbildung 1.5: LC Neurone zeigen eine Ca^{2+} Leitfähigkeit mit niedrigem Aktivierungsschwellenwert.

Abbildung (A) zeigt repräsentative Ströme eines LC Neurons im akuten Hirnschnitt als Antwort auf das oben abgebildete Spannungsprotokoll. Der als Einsatz abgebildete, vergrößerte Ausschnitt verdeutlicht das Auftreten von Ca^{2+} Einwärtsströmen bei Spannungssprüngen zu negativen Potenzialen. Mittels des in Abbildung (B) oben gezeigten Spannungsprotokolls wurde das Inaktivierungsverhalten dieser Ca^{2+} Leitfähigkeit bestimmt. Schon bei Vordepolarisationen ab -80 mV ist der Ca^{2+} Influx auf einen darauffolgenden Sprung zu -40 mV verringert (farblich gekennzeichnete Stromspuren). Abbildung (C) illustriert die Inaktivierungskurve, die mittels der Boltzmann-Gleichung berechnet wurde. Hierzu wurden die bei -40 mV auftretenden Ströme (siehe Pfeil in B) auf den maximalen Strom normalisiert und gegen das vor dem Sprung zu -40 mV angelegte Potenzial aufgetragen. Die $V_{1/2 \text{ Inakt.}}$ beschreibt das Membranpotenzial, bei dem die Hälfte der Kanäle bereits inaktiviert sind. Abbildung modifiziert nach Matschke *et al.*, 2015.

1.3 Die Familie der Kaliumselektiven Ionenkanäle

Kaliumselektive Ionenkanäle sind transmembranäre Proteine, die sich durch ihre selektive Permeabilität für K^+ auszeichnen. Unter physiologischen Bedingungen bewirkt das Öffnen von Kaliumkanälen einen K^+ Efflux und verschiebt das Membranpotenzial der Zelle in Richtung des K^+ Gleichgewichtspotenzials, welches in zentralen Neuronen bei etwa -70 mV liegt. Die Hauptfunktion der Kaliumkanäle in neuronalen Zellen besteht in der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials, der Repolarisation und Hyperpolarisation des APs und damit in der Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit (Hille, 2001).

Sowohl funktionell als auch strukturell bilden Kaliumkanäle eine heterogene Gruppe, die in vier Hauptfamilien unterschieden wird: die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_v), die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}), die einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle (K_{ir}) und die Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle (K_2P). Die G-Protein regulierten K^+ Kanäle bilden die Unterfamilie K_{ir3} der K_{ir} Kanäle und werden auch als GIRK Kanäle (für engl. *G-protein coupled inwardly rectifying K^+ channels*) bezeichnet (Gutman *et al.*, 2005, Huang und Jan, 2014) (Abbildung 1.6).

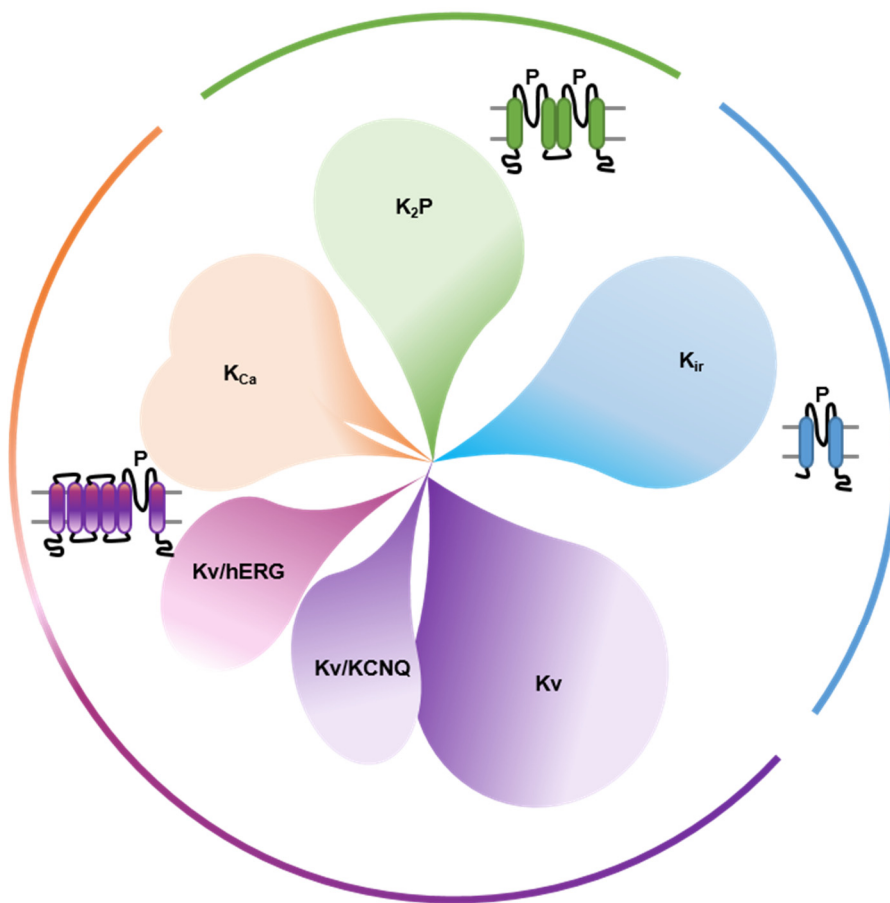


Abbildung 1.6: Vereinfachte Systematik der vier Hauptfamilien der Kaliumselektiven Ionenkanäle.

Die Kaliumselektiven Ionenkanäle werden in die vier Hauptfamilien der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_v), der calcium-aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}), der einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle (K_{ir}) und der Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle (K_2P) eingeteilt. Die drei Unterfamilien der K_v Kanäle (K_v , $KCNQ$ und $hERG$) und die K_{Ca} Kanäle verbindet der Aufbau aus vier α -Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und der Porenschleife zwischen S5 und S6 (violett gefärbter Einsatz). K_{ir} Kanäle sind Tetramere aus α -Untereinheiten mit lediglich zwei Transmembrandomänen (blau gefärbter Einsatz). Die α -Untereinheiten der K_2P Kanäle bestehen aus vier Transmembrandomänen mit jeweils zwei Porenschleifen (grün gefärbter Einsatz). Im Gegensatz zu der tetrameren Anordnung der anderen K^+ Kanal Familienmitglieder ist der funktionelle K_2P Kanal ein Dimer.

1.3.1 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv)

Ein gemeinsames Charakteristikum aller spannungsabhängigen Kaliumkanäle ist die Sensitivität gegenüber Spannungsänderungen der Zellmembran. Generell kommt es bei der Depolarisation des Membranpotenzials zur Aktivierung und bei der Repolarisation zur Deaktivierung des Kv Kanals. Im Falle einiger Kv Kanal Subtypen führt eine anhaltende Depolarisation des Weiteren zur Inaktivierung. Funktionelle Kv-Kanäle sind Homo- oder Heterotetramere aus α -Untereinheiten einer Kanal-Subfamilie. In den 1980er Jahren wurde das erste für eine Kv α -Untereinheit kodierende Gen aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* kloniert und mit *Shaker* benannt (Papazian *et al.*, 1987). Im humanen Genom wurde seither eine Vielzahl von Genen identifiziert, die für Kv α -Untereinheiten kodieren. Anhand der Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz werden die Kv Kanäle nun in die Unterfamilien Kv1-Kv12 eingeteilt (Gutman *et al.*, 2005). Jede Kv α -Untereinheit weist sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und einen intrazellulären N- und C-Terminus auf. Das S4-Segment beinhaltet mehrere positiv geladene Reste der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin und kann so Änderungen der Membranspannung detektieren und in Konformationsänderungen des Kanals umsetzen (Nerbonne, 2000). Die S5- und S6-Domänen der vier Untereinheiten bilden die Seitenwände der zentralen K⁺ Ionen leitenden Pore. Die Poren-Schleifen, welche sich jeweils zwischen S5 und S6 befinden, fungieren mittels der innerhalb der Kaliumkanalfamilie konservierten Aminosäuresequenz Threonin-Valin-Glycin-Tyrosin-Glycin (TXGYG) als Selektivitätsfilter (Heginbotham *et al.*, 1992). Die Assemblierung der α -Untereinheiten zu Tetrameren wird innerhalb des endoplasmatischen Retikulums durch eine N-terminale Tetramerisierungsdomäne (T1) vermittelt (Yi *et al.*, 2001). Verschiedene akzessorische Proteine, darunter das transmembranäre Protein minK (Sanguinetti *et al.*, 1996) und die zytosolischen Proteine Kv β 1-3 (Rettig *et al.*, 1994) können mit dem Kanal-Tetramer assoziieren. Die elektrophysiologischen Eigenschaften, das heißt die Kinetiken der Aktivierung, Deaktivierung und Inaktivierung, der Kv Kanäle hängen stark von der jeweiligen Untereinheitenzusammensetzung ab. Es werden zwei Inaktivierungsmechanismen unterschieden, die N-Typ Inaktivierung und die C-Typ Inaktivierung. Die meist langsame C-Typ Inaktivierung ist ein Merkmal der verzögerten Gleichrichter Kaliumkanäle (*delayed rectifier*), während die schnelle N-Typ Inaktivierung charakteristisch für A-Typ Kaliumkanäle ist. Die C-Typ Inaktivierung beruht auf Konformationsänderungen im Bereich des oberen S6 Segmentes und der Porenschleife. Es wird vermutet, dass es hierbei zu Interaktionen bestimmter Aminosäurereste kommt, welche einen partiellen Porenkollaps im Bereich des Selektivitätsfilters auslösen (Kurata und Fedida, 2006, Hoshi *et al.*, 1991). Aufgrund der Rückbewegung des Spannungssensors schließen die *delayed rectifier* Kanäle während der Repolarisation der Zellmembran. Dieser Prozess wird als Deaktivierung bezeichnet. Die N-Typ Inaktivierung beruht darauf, dass Aminosäuren des N-terminalen Kanalabschnittes einen

Inaktivierungspartikel bilden, welcher in die offene Kanalpore eindringt und diese blockiert. Da dies zu einer Inaktivierung im Bereich von Millisekunden führt, vermitteln A-Typ-Kaliumkanäle einen transienten Strom, der als I_A oder I_{to} (engl. für *transient outward*) bezeichnet wird (Ruppersberg *et al.*, 1991). In heterologen Expressionssystemen zeigen lediglich die Subtypen Kv1.4 und Kv4.3 eine N-Typ Inaktivierung (Snyders, 1999). Trotz des fehlenden Inaktivierungspartikels vermitteln auch Kanäle der Kv4 Familie einen transienten Strom. Es wird postuliert, dass dies auf eine schnelle Form der C-Typ Inaktivierung zurückzuführen ist (Jerng, 1999). Durch Anlagerung akzessorischer Kvβ1 Untereinheiten können auch *delayed rectifier* Kanäle eine N-Typ Inaktivierung aufweisen. Dieser Effekt beruht darauf, dass alle Kvβ1 Untereinheiten (Kvβ1.1-Kvβ1.3) einen N-terminalen Inaktivierungspartikel besitzen, welcher nach Assoziation mit dem N-Terminus der Kv α- Untereinheit den Porenblock vermittelt (Rettig *et al.*, 1994, Decher *et al.*, 2008). Heterotetramere, die Kv1.6 Untereinheiten beinhalten, bilden hier eine Ausnahme. Aufgrund einer N-terminal lokalisierten „N-Typ-Inaktivierungs-Präventions-Domäne“ (*NIP-domain*) wird die Bindung des Kvβ-Inaktivierungspartikels und somit die Konversion in einen A-Typ Kanal verhindert (Roeper *et al.*, 1998). Der Prozess der N-Typ Inaktivierung wird über verschiedene intrazelluläre Einflüsse moduliert. Es wurde unter anderem dokumentiert, dass die Kvβ1 vermittelte Inaktivierung sensitiv gegenüber dem oxidativen Potenzial der Zelle ist. So kann die Applikation oxidierender Agenzien die N-Typ Inaktivierung aufheben (Wang *et al.*, 1996). Sowohl Ströme, die von *delayed rectifier* als auch von A-Typ K^+ Kanälen vermittelt werden, wurden in LC Neuronen beschrieben. So ist die Inhibition einer anhaltenden K^+ Strom Komponente an der Orexin vermittelten Depolarisation coeruleärer Neurone beteiligt (Murai und Akaike, 2005). In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass der A-Typ Strom in LC Neuronen etwa die Hälfte des gesamten K^+ Auswärtsstromes ausmacht. Des Weiteren deutete die 50 %-ige Inaktivierung mit einer Zeitkonstanten von 3,8 ms bei +20 mV auf die Koexpression von Kv1- und Kvβ1-Kaliumkanal-Untereinheiten hin (Matschke, 2011). Die molekulare Identität der Kv Kanäle, die diesen Leitfähigkeiten unterliegen, ist jedoch bisher unklar.

1.3.2 Ca^{2+} aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca})

Das Hauptcharakteristikum und Namensgeber der K_{Ca} Kanäle ist die Aktivierung bei steigenden intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen ($[Ca^{2+}]_i$). K_{Ca} Kanäle vermitteln einen K^+ Efflux, welcher wiederum indirekt über die Hyperpolarisation des Membranpotenzials und Deaktivierung von Cav Kanälen zur Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ beiträgt (Fakler und Adelman, 2008). Basierend auf ihren biophysikalischen Eigenschaften werden die K_{Ca} Kanäle in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe besteht aus den spannungsunabhängigen Subtypen $K_{Ca}2.1$ (SK1), $K_{Ca}2.2$ (SK2), $K_{Ca}2.3$ (SK3) sowie $K_{Ca}3.1$ (IK).

Während die SK Kanäle durch eine geringe Einzelkanalleitfähigkeit von 8-10 pS gekennzeichnet sind (SK steht für engl. *small conductance*), liegt die Leitfähigkeit des IK bei etwa 11 pS (IK steht für engl. *intermediate conductance*) (Wei *et al.*, 2005). Die zweite Gruppe umfasst einerseits den funktionell zu den SK Kanälen und dem IK Kanal verwandten Subtyp $K_{Ca1.1}$, welcher aufgrund der großen Einzelkanalleitfähigkeit auch BK (BK steht für engl. *big conductance*) oder Maxi-K genannt wird sowie die mittlerweile als Ca^{2+} insensitiv identifizierten Subtypen $K_{Ca4.1}$, $K_{Ca4.2}$ und $K_{Ca5.1}$ (Abbildung 1.7). Für SK1, SK2 und SK3 existieren darüber hinaus Splicevarianten, deren Funktion bislang ungeklärt ist (Kuiper *et al.*, 2012). Sowohl BK- als auch SK Kanäle sind an der Regulation vielfältiger physiologischer Prozesse beteiligt. So kontrollieren SK Kanäle unter anderem das Zellvolumen roter Blutkörperchen, die Aktivierung von Mikroglia und Lymphozyten sowie das Entladungsmuster und die Signaltransduktion zentraler Neurone. Während SK1 und SK2 vornehmlich in Neuronen des ZNS exprimiert sind, ist SK3 zusätzlich in Glia-Zellen, Endothelien und glatten Muskelzellen zu finden (Berkefeld *et al.*, 2010). Zahlreiche Studien dokumentieren, dass SK Kanäle maßgeblich an der Modulation der Nachhyperpolarisation erregbarer Zellen beteiligt sind und so die AP-Frequenz regulieren. SK Kanäle liegen oft in Assoziation mit Neurotransmitter-Rezeptoren, darunter NMDA-Rezeptoren und nikotinerge Ach-Repetoren, vor. Kommt es nach Aktivierung dieser ionotropen Rezeptoren zu einem Ca^{2+} Influx, werden die SK Kanäle aktiviert und wirken dem evozierten synaptischen Potenzial entgegen. Auf diese Weise können SK Kanäle maßgeblich zur Regulation der neuronalen Erregbarkeit beitragen (Dolga und Culmsee, 2012, Faber *et al.*, 2005).

Der funktionelle SK Kanal ist ein Multiproteinkomplex, dessen zentrales Element die $SK\alpha$ -Untereinheit darstellt. Die α -Untereinheit teilt die Topologie der Kv Kanäle mit sechs Transmembrandomänen und der Porenregion zwischen S5 und S6 sowie die Konsensussequenz des Selektivitätsfilters. Da dem S4 Segment jedoch die positiv geladenen Aminosäurereste fehlen, ist das Öffnungs- und Schließverhalten der SK Kanäle unabhängig von Änderungen der Membranspannung (Kuiper *et al.*, 2012). Als Ca^{2+} Sensor der SK Kanäle dient das Protein Calmodulin (CaM), welches konstitutiv an den C-Terminus der $SK\alpha$ -Untereinheit gebunden ist (Xia *et al.*, 1998). Bindet Ca^{2+} an das CaM werden Konformationsänderungen nahe des Selektivitätsfilters induziert, welche zur Öffnung der Kanalpore führen (Bruening-Wright *et al.*, 2007). Weitere konstitutive Bestandteile des SK Proteinkomplexes sind die Proteinkinase Casein Kinase 2 (CK2) sowie die Proteinphosphatase 2A (PP2A) (Abbildung 1.7). Während die Phosphorylierung des CaM durch CK2 zu einer Verringerung der Ca^{2+} Sensitivität des SK Kanals führt, wird diese durch die PP2A vermittelte Dephosphorylierung des CaM erhöht (Berkefeld *et al.*, 2010).

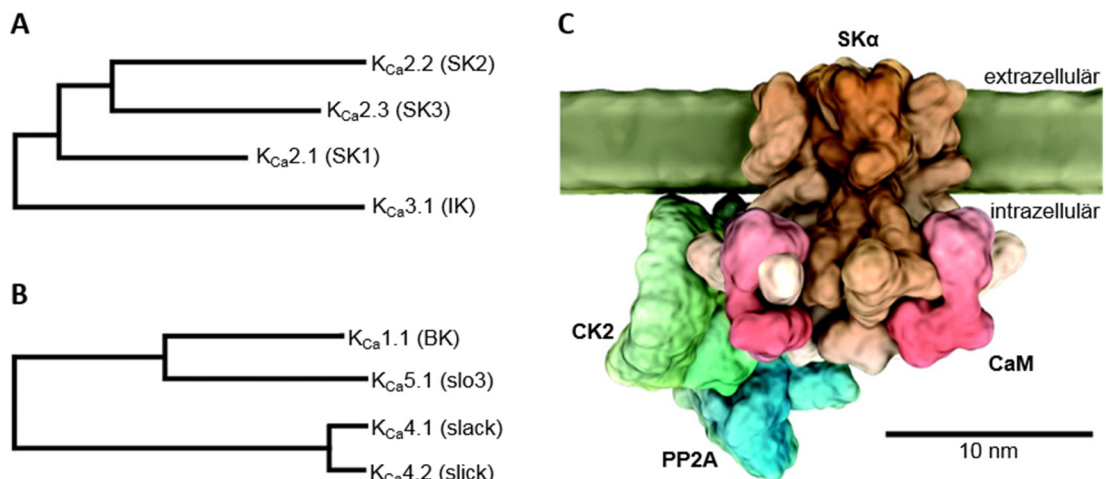


Abbildung 1.7: Verwandtschaftsbeziehung der K_{Ca}- und Aufbau der SK Kanäle

Abbildung (A) und (B) illustrieren die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der K_{Ca}2/3, beziehungsweise der K_{Ca}1/4/5 Gruppen. Die erste Gruppe besteht aus den spannungsunabhängigen Subtypen K_{Ca}2.1 (SK1), K_{Ca}2.2 (SK2), K_{Ca}2.3 (SK3) sowie K_{Ca}3.1 (IK). Die zweite Gruppe umfasst den funktionell zur K_{Ca}2/3 Gruppe verwandten Subtyp K_{Ca}1.1 (BK) sowie die Subtypen K_{Ca}4.1 (slack), K_{Ca}4.2 (slick) und K_{Ca}5.1 (slo3). (C) Der funktionelle SK Kanal ist ein Multiproteinkomplex mit der SK α Untereinheit als zentrales Element. Das Protein Calmodulin (CaM) ist an den C-Terminus der SK α -Untereinheit gebunden und dient als Ca²⁺ Sensor der SK Kanäle. Die Proteinkinase Casein Kinase 2 (CK2) sowie die Proteinphosphatase 2A (PP2A) sind weitere konstitutive Bestandteile des SK Proteinkomplexes, welche die Ca²⁺ Sensitivität des SK Kanals modulieren. Abbildung (C) modifiziert nach Berkefeld *et al.*, 2010.

1.3.2.1 Pharmakologie der SK Kanäle

SK Kanäle werden von einer Vielzahl pharmakologischer Substanzen beeinflusst. Das Peptidtoxin des Bienengiftes Apamin blockiert selektiv SK1, SK2 und SK3 Kanäle. Mit einem IC₅₀ Wert von etwa 70 pM wirkt Apamin am potentesten auf SK2 Kanäle, aber auch der IC₅₀ Wert für die Inhibition von SK1 und SK3 Kanälen liegt im einstelligen nanomolaren Bereich (Köhler *et al.*, 1996, Lamy *et al.*, 2010). Der Apamin vermittelte Block ist allosterisch und benötigt sowohl eine Bindung an Aminosäuren der extrazellulären S3-S4 Schleife als auch an die äußere Porenregion des SK Kanals (Lamy *et al.*, 2010). Neben Apamin wurden auch die Peptide Leiurotoxin I und Tamapin als SK Kanal Blocker, jedoch mit IC₅₀ Werten im mikromolaren Bereich, identifiziert (Kuiper *et al.*, 2012). Neben SK Kanal Antagonisten existieren verschiedene organische Substanzen, welche die Ca²⁺ abhängige Aktivierung der SK Kanäle erleichtern und so als positive Modulatoren wirken. Das 1-Ethyl-2-Benzimidazolinon (1-EBIO) wurde als erster positiver Modulator von SK und IK Kanälen mit einem EC₅₀ (mittlere effektive Konzentration) im mikromolaren Bereich beschrieben (Hougaard *et al.*, 2007). Ein wesentlich hochaffinerer positiver Modulator ist die Substanz 6,7-Dichloro-1H-Indol-2,3-Dion 3-Oxim (NS309), welche sowohl auf SK als auch auf IK Kanäle mit einem EC₅₀ Wert im Bereich von 10 nM wirkt (Strøbaek *et al.*, 2004). Auch die

Substanz CyPPA wird experimentell als positiver Modulator von SK2 und SK3 Kanälen eingesetzt, gegenüber SK1 und IK Kanälen ist CyPPA hingegen nahezu inaktiv (Hougaard *et al.*, 2007).

1.3.2.2 SK Kanäle in LC Neuronen

Die Existenz einer Ca^{2+} abhängigen K^+ Leitfähigkeit in Locus Coeruleus Neuronen der Ratte wurde erstmalig in den 1990er Jahren von Osmanovic *et al.* beschrieben. Es wurde dokumentiert, dass die Applikation des SK Kanal Blockers Apamin hier zur Reduktion einer Komponente der Nachhyperpolarisation sowie zur Steigerung der AP-Rate als Antwort auf einen depolarisierenden Stimulus führt (Osmanović *et al.*, 1990). Die Gruppe um Murai *et al.* postulierte später eine Rolle Ca^{2+} aktivierter K^+ Kanäle während ischämischer Bedingungen in dissoziierten Ratten LC-Neuronen (Murai *et al.*, 1997). Bisher existieren jedoch keine Studien, die die Funktion und molekulare Identität der K_{Ca} Kanäle in murinen LC Neuronen beleuchten.

1.4 Die Parkinson-Krankheit

Die Parkinson-Krankheit (engl. *Parkinson's disease*, PD), auch idiopathisches Parkinson-Syndrom genannt, betrifft etwa 1% der Weltbevölkerung und ist damit nach der Alzheimer-Krankheit die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Als Erkrankung des Alters wird die PD meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr klinisch manifest, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (de Lau und Breteler, 2006). Trotz umfangreicher Studien fehlen effektive, auf dem Krankheitsmechanismus beruhende Therapie-Strategien, so dass eine Heilung der PD bislang nicht möglich ist.

1.4.1 Symptomatik und Pathogenese

Die neurologischen Leitsymptome der PD sind die allgemeine Bewegungsarmut (Akinese), der gesteigerte Muskeltonus (Rigor), der Ruhetremor sowie die posturale Instabilität (Selikhova *et al.*, 2009). Neben diesen motorischen Symptomen leiden PD Patienten jedoch auch unter zahlreichen nichtmotorischen Dysfunktionen wie Riechstörungen, RBD, Verdauungsstörungen, Demenz, Depression, Psychosen und kognitiven Störungen (Langston, 2006, O'Sullivan *et al.*, 2008). Das neuropathologische Korrelat der motorischen PD Symptome ist der Verlust dopaminerg Neurone der SNpc. Die SNpc ist Teil der motorischen Basalganglienschleife und projiziert dopaminerg in das Striatum. Auf komplexe Weise kommt dem Dopamin hier eine modulierende und insgesamt motorikfördernde Aufgabe bei der Ausführung willkürlicher Bewegungen zu (Purves *et al.*, 2008).

Sinkt durch die progressive Degeneration der SNpc Neurone die Dopamin-Konzentration im Striatum kommt es sukzessive zur Ausbildung der oben genannten motorischen Leitsymptome (Alberio *et al.*, 2012). In den vergangenen Jahrzehnten haben zahlreiche Studien gezeigt, dass neben dem Dopamin-System auch Störungen serotonerger, cholinерger und noradrenerger Transmittersysteme an der Pathologie der PD beteiligt sind und das Auftreten der vielfältigen nichtmotorischen Symptome bedingen (Mann und Yates, 1983). Als histopathologisches Merkmal der PD gelten eosinophile Einschlusskörperchen, sogenannte Lewy-Körperchen, welche aus Proteinaggregaten mit einem hohen Anteil des Proteins α -Synuklein bestehen. Anhand des Auftretens von Lewy-Körperchen in den von PD betroffenen Hirnregionen beschreibt das Stufenmodell nach Braak *et al.* sechs Stadien, die das zeitliche Fortschreiten der Erkrankung definieren (Abbildung 1.8).

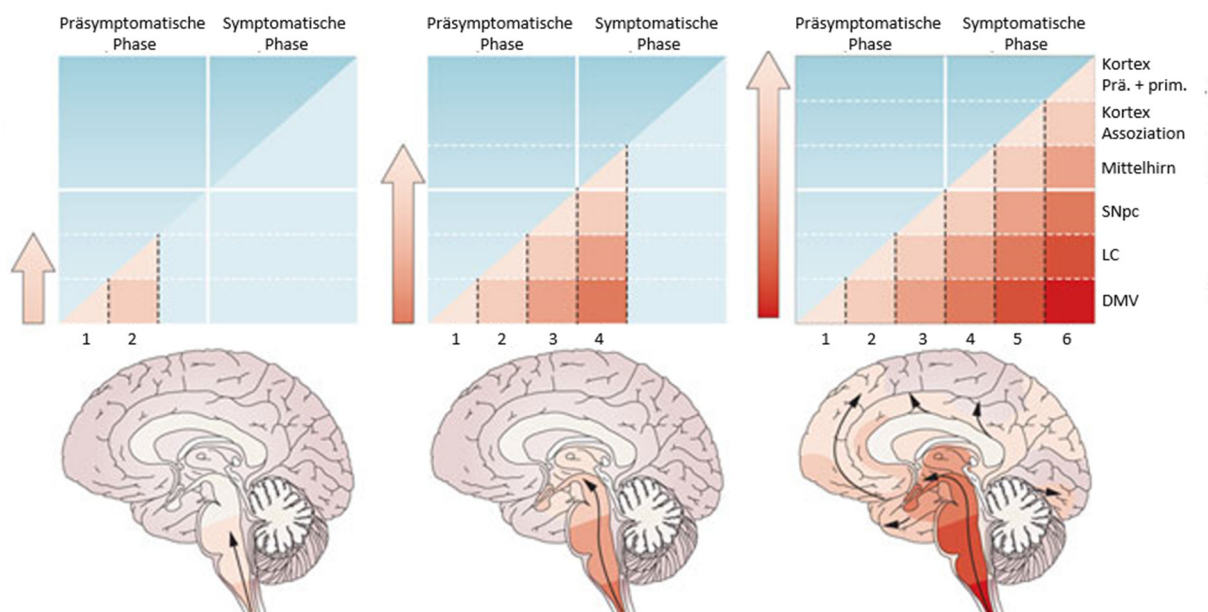


Abbildung 1.8: Stadien der PD Pathogenese nach Braak.

Das Fortschreiten der pathologischen Veränderungen bei der Parkinson-Erkrankung wird von Braak *et al.* anhand des Auftretens von Lewy-Körperchen in sechs Stadien eingeteilt. In Stadium 1 treten pathologische Veränderungen des dorsalen motorischen Nucleus des Nervus Vagus (DMV) auf, in Stadium 2 sind Kerngebiete des pontinen Tegmentums, darunter der Locus Coeruleus (LC) betroffen. In Stadium 3 finden sich Lewy-Körperchen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) und breiten sich in Stadium 4 weiter im Mittelhirn aus. Die ersten klinischen Symptome treten während der Stadien 3 oder 4 auf. In den Stadien 5 und 6 sind schließlich zunächst die Assoziationsfelder und zuletzt auch die prämotorischen Felder und Primärgebiete des Kortex von pathologischen Veränderungen betroffen. Abbildung modifiziert nach Goedert *et al.*, 2012.

Während der prodromalen, motorisch asymptomatischen Phase kommt es im Stadium 1, möglicherweise ausgehend vom enterischen Nervensystem oder dem Riechepithel, zum Auftreten von Lewy-Körperchen im dorsalen motorischen Kern des Nervus Vagus (DMV) oder dem Bulbus Olfactorius. Im Stadium 2 sind Nuclei des unteren Hirnstammes, darunter auch der LC betroffen und im Stadium 3 schließlich Kerngebiete des limbischen Systems sowie die SNpc. Im Stadium 4, welches den Beginn der symptomatischen Phase markiert, breitet sich der pathologische Prozess auf den Thalamus und das Striatum aus. In den Stadien 5 und 6 sind Lewy-Körperchen in den Assoziationsfeldern und schließlich auch in den prämotorischen Feldern und Primärgebieten des Neokortex nachweisbar (Braak *et al.*, 2003, Braak und Del Tredici, 2010).

Obwohl kontrovers diskutiert wird, ob das zeitlich versetzte Auftreten der Lewy-Körperchen direkt mit der Neurodegeneration korreliert, wird davon ausgegangen, dass der LC schon sehr früh in der Pathogenese der PD und weit vor Auftreten der ersten motorischen Symptome von pathologischen Veränderungen betroffen ist (Espay *et al.*, 2014). Anhand von Autopsien wurde gezeigt, dass Gehirne von PD Patienten eine 60- bis 80-prozentige Reduktion der Zellzahl im LC im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollpersonen zeigen (German *et al.*, 1992). Zusätzlich wurde eine noradrenerge Denervation des Frontalhirns, des Kleinhirns, des Striatums, des Thalamus und des Hypothalamus in PD Gehirnen dokumentiert, welche auf den Funktionsverlust des LC zurückzuführen ist (Kish *et al.*, 1984, Shannak *et al.*, 1994, Pavese *et al.*, 2011). Klinisch korreliert der Verlust coeruleer Neurone mit einer Vielzahl der im Verlauf der PD auftretenden psychiatrischen Dysfunktionen, den RBD und der beeinträchtigten Kognition. Zusätzlich wird der Noradrenalin-Mangel für das bei etwa der Hälfte der PD Patienten beobachtete Phänomen des plötzlichen „Einfrierens“ von Bewegungen (engl. *freezing of gait*) verantwortlich gemacht (Espay *et al.*, 2014). Seit den 1990er Jahren weisen Studien daraufhin, dass der Neuronenverlust des LC und der SNpc keine voneinander isolierten Prozesse darstellen, sondern eng miteinander korrelieren. So wurde in Neurotoxin- basierten Tiermodellen der PD gezeigt, dass eine Läsion des LC vor Administration der Toxine MPTP oder 6-Hydroxydopamin zu einer stark vermehrten Degeneration dopaminerger Neurone der SNpc führt (Bing *et al.*, 1994, Fornai *et al.*, 1995). Die experimentelle Steigerung der Noradrenalinsynthese kann die durch die MPTP-Exposition verursachte Dopamin-Depletion in der SNpc hingegen verringern (Kilbourn *et al.*, 1998). In elektrophysiologischen Untersuchungen des *in vivo* Aktivitätsmusters der SNpc der Ratte wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Stimulation des LC zu einer gesteigerten Entladungsrate der SNpc führt (Grenhoff *et al.*, 1993). Diese Studien ließen schon früh die Vermutung einer direkten Verbindung zwischen dem LC und der SNpc einerseits und einer neuroprotektiven Wirkung des Noradrenalins andererseits zu. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass Noradrenalin über adrenerge Rezeptoren die Transkription von

Wachstumsfaktoren, „*immediate early*“-Genen und antiinflammatorischen Zytokinen induzieren und weiterhin als endogenes Antioxidanz wirken kann. Dies könnte die Grundlage der putativen neuroprotektiven Noradrenalin-Wirkung darstellen (Rommelfanger und Weinshenker, 2007). Therapie-Strategien, die den Verlust noradrenerger LC Neurone verhindern, könnten demnach nicht nur zur Symptomlinderung dienen, sondern eventuell auch dem Fortschreiten der PD entgegenwirken.

1.4.2 Neurodegeneration und metabolischer Stress

Das Ziel einer großen Anzahl an Studien in den vergangenen Jahrzehnten lag darin Faktoren zu identifizieren, die das Risiko an PD zu erkranken erhöhen. Als die vier bedeutendsten dieser Faktoren wurden das Alter, genetische Mutationen, Umwelttoxine und Inflammation identifiziert. Obwohl der genaue Mechanismus der Zelldegeneration noch unbekannt ist, ist ein gemeinsames Merkmal dieser Risikofaktoren die Assoziation mit mitochondrialer und/oder proteostatischer Dysfunktion und daraus resultierendem metabolischem Zellstress (Surmeier *et al.*, 2011). Metabolischer Zellstress kann unter anderem durch die Inhibition des Komplexes 1 der mitochondrialen Atmungskette hervorgerufen werden. Die Atmungskette ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und generiert mittels der oxidativen Phosphorylierung das zur Energieversorgung der Zelle notwendige Adenosintriphosphat (ATP). Als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung werden auch im normalen Zellstoffwechsel ständig freie Radikale (engl. *reactive oxygen species*, ROS) gebildet (Mounsey und Teismann, 2010). Zu diesen sehr reaktiven Verbindungen zählen unter anderem die Superoxid-Anionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und die Hydroxylradikale ($OH\cdot$), welche umliegende Zellstrukturen durch Oxidation schädigen können. Im Normalfall können die ROS durch verschiedene antioxidative Mechanismen eliminiert werden. Wenn die ROS-Produktion jedoch unter pathologischen Bedingungen, zum Beispiel durch mitochondriale Defekte so stark ansteigt, dass die Inaktivierungsmechanismen überlastet werden, spricht man von oxidativem Stress (Andersen, 2004). In *post-mortem* Analysen des Hirngewebes von PD Patienten wurden erhöhte Level von Markern oxidativ geschädigter Proteine sowie erniedrigte Konzentrationen neutralisierender Antioxidantien nachgewiesen (Alam *et al.*, 1997, Giasson *et al.*, 2000). Neben der Suche nach allgemeinen Risikofaktoren bleibt die Frage, warum bestimmte Neuronengruppen des Gehirns vulnerabel während der Pathogenese der PD sind, andere hingegen verschont bleiben. Eine der derzeit führenden Theorien ist, dass diese Neurone besonders sensibel gegenüber oxidativem Zellstress sind. Als Ursachen für diese erhöhte Sensibilität werden i) der Metabolismus des Neurotransmitters Dopamin, währenddessen es zur erhöhten ROS-Bildung kommt, ii) die langen Axone mit geringer oxidativer Kapazität sowie iii) der physiologische Phänotyp mit unzureichender Ca^{2+} Puffer-Kapazität diskutiert (Surmeier *et al.*, 2011). Jüngere Studien zeigen, dass aktivitätsabhängiger oxidativer Stress ein

gemeinsames Merkmal von LC, SNpc und DMV Neuronen darstellt. Der intrinsische Schrittmachermechanismus dieser Neuronengruppen korreliert mit Ca^{2+} Oszillationen, vermittelt durch L-Typ Ca^{2+} Kanäle, die aufgrund geringer Puffer Kapazitäten zu einem erhöhten intrazellulären Ca^{2+} Level und zu mitochondrialem oxidativen Stress führen (Goldberg *et al.*, 2012, Sanchez-Padilla *et al.*, 2014, Chan *et al.*, 2007). Zur Elimination des Ca^{2+} aus dem Intrazellulärraum mittels spezifischer Pumpen (SERCA) oder Austauschern (NCX) wird ständig ATP benötigt. Im Szenario der PD Pathogenese führt die basal erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration über die Stimulation der Atmungskette zu einer erhöhten ROS-Produktion der Mitochondrien und so zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber Toxinen, die zusätzlichen oxidativen Stress verursachen (Surmeier *et al.*, 2011). Die Existenz des Schrittmachermechanismus im LC, der SNpc und dem DMV bringt des Weiteren mit sich, dass sich das Membranpotenzial dieser Neurone in einem depolarisierten Bereich befindet, wodurch der Mg^{2+} Block Ca^{2+} permeabler Glutamat-Rezeptoren vom NMDA-Typ aufgehoben wird. Eine vermehrte Rekrutierung dieser Rezeptoren kann einen massiven Ca^{2+} Einstrom und weitere Depolarisation bewirken. Diese anhaltende Erregung wird als Exzitotoxizität bezeichnet, da sie schließlich intrazelluläre Prozesse aktivieren und zum Zelltod führen kann (Beal, 1998). In dopaminergen Neuronen der SNpc dienen SK Kanäle als Ca^{2+} Sensoren und kontrollieren die Aktivität von NMDA-Rezeptoren. Es wird postuliert, dass die Aktivierung dieser Kanäle daher zur Normalisierung einer gestörten Ca^{2+} Homöostase beitragen kann (Dolga und Culmsee, 2012). Auch die Inhibition von L-Typ Ca^{2+} Kanälen mittels Dihydropyridin-Derivaten wird bereits als vielversprechender Therapie-Ansatz gesehen. So zeigen retrograde Studien, dass mit DHPs behandelte Patienten ein um etwa 30% erniedrigtes PD Risiko haben (Surmeier *et al.*, 2011). Ionenkanäle stellen somit vielversprechende Ziele in der Therapie der PD dar und ihre Charakterisierung kann zum Verständnis der selektiven Vulnerabilität der betroffenen Neuronengruppen beitragen.

1.4.3 *In vitro* Modellsysteme der Parkinson-Krankheit

Der Etablierung reproduzierbarer *in vitro* Modelle der PD ist ein Großteil des heutigen Wissens über die zellulären und biochemischen Störungen, die während der Pathogenese der PD auftreten, zu verdanken. Heutzutage sind mehrere Substanzen bekannt, die bei Verabreichung irreversible Schäden dopaminerger und noradrenerger Neurone und somit Parkinson ähnliche Symptome hervorrufen. Das erste und immer noch gängige Modell zur Auslösung des experimentellen Parkinson-Syndroms ist die Applikation der Substanz 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) (Oertel und Kupsch, 1993). MPTP wird im Gehirn in das Toxin MPP^+ umgewandelt, welches dann selektiv von dopaminergen Zellen aufgenommen wird und mit der mitochondrialen Atmungskette interferiert (Mounsey und Teismann, 2010). Weitere gängige Substanzen sind das Dopamin-Analogon 6-Hydroxydopamin (6-

OHDA) sowie das Pestizid Rotenon. Rotenon wurde bereits im 17. Jahrhundert in Südamerika zur Paralyse von Fischen verwendet und wird auch heutzutage noch in England und den Vereinigten Staaten als Pestizid eingesetzt. Epidemiologische Studien konnten bereits eine Korrelation von regelmäßigem Pestizid-Kontakt und einem erhöhten Risiko an PD zu erkranken feststellen (Elbaz und Tranchant, 2007). Aufgrund seiner lipophilen Struktur kann Rotenon schnell die Blut-Hirn-Schranke passieren und diffundiert innerhalb der Neurone in intrazelluläre Kompartimente. Innerhalb der Mitochondrien inhibiert das Toxin spezifisch den Komplex 1 der Atmungskette (Mounsey und Teismann, 2010). In Rotenon exponierten Ratten zeigen dopaminerge Neurone der SNpc fibrilläre Einschlüsse, die Lewy-Körperchen ähneln und immunreaktiv für α -Synuklein sind. Auch die für PD typischen Verhaltensstörungen treten nach chronischer Rotenon-Gabe im Tiermodell auf (*Betarbet et al.*, 2000). Neben der SNpc zeigen außerdem auch noradrenerge Neurone des LC nach Rotenon Exposition PD ähnliche pathologische Veränderungen (Chaves *et al.*, 2010).

1.5 Zielsetzungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die molekulare Komposition und Funktion verschiedener Ionenkanalfamilien in Locus Coeruleus Neuronen der Maus charakterisiert werden. Ein Schwerpunkt lag in der Untersuchung einzelner Locus Coeruleus Neuronen in akuten Hirnstammschnitten mittels der Patch Clamp Technik. Ergänzend wurden molekularbiologische, immunhistochemische und stereologische Methoden verwendet. Mittels dieser Techniken sollte zunächst eine generelle elektrophysiologische Charakterisierung des Aktivitätsmusters muriner LC Neurone erfolgen und ein Profil bezüglich der Expression kaliumselektiver Ionenkanäle sowie spannungsgesteuerter Calcium Kanäle in diesen Neuronen erstellt werden. Dies sollte dazu dienen, Ionenkanalfamilien zu identifizieren, die die elektrische Aktivität der LC Neurone modulieren und so eine Rolle bei der Entstehung von aktivitätsabhängigem oxidativem Stress spielen könnten.

Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der funktionellen Charakterisierung spannungsgesteuerter Calcium Kanäle, die bei niedrigen Membranpotenzialen aktivieren. Die in meiner Diplomarbeit aufgestellte Hypothese, dass LC Neurone funktionelle Cav Kanäle der Unterfamilien Cav1 und Cav3 exprimieren sollte überprüft werden. Durch die Kombination elektrophysiologischer und pharmakologischer Methoden sollte beleuchtet werden, welchen Anteil die von den jeweiligen Cav Kanal Familien vermittelten Stromkomponenten am Gesamt Ca^{2+} Strom von LC Neuronen haben. Des Weiteren sollte eine mögliche Rolle der Cav Kanäle bei der Generierung des intrinsischen Schrittmachermechanismus von LC Neuronen aufgeklärt und die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieser Ergebnisse im Hinblick auf die Parkinson-Erkrankung diskutiert werden.

Ein weiterer Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der funktionellen Charakterisierung von Ca^{2+} aktivierten Kaliumkanälen, hier insbesondere der SK Kanäle, in LC Neuronen. Mittels der Verwendung spezifischer Inhibitoren und Aktivatoren sollte untersucht werden, ob SK Kanal vermittelte Ströme zu der auf ein AP folgenden Nachhyperpolarisation von LC Neuronen beitragen und ob sie so zur Modulation des intrinsischen Schrittmachermechanismus beitragen können. Des Weiteren sollte die Hypothese überprüft werden, dass die Aktivierung von SK Kanälen über die Normalisierung der Ca^{2+} Homöostase, neuroprotektiv im Kontext für die Parkinson Erkrankung relevanter Toxizitätsmodelle sein könnte.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Juvenile (postnatale Tage 15–20) oder ältere (postnatale Tage 35–40) männliche C57BL/6j Mäuse wurden in Gruppen von drei bis fünf Tieren bei einem 12 Stunden Tag/ 12 Stunden Nacht Zyklus und Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Die Pflege der Tiere sowie alle durchgeführten Experimente waren in Übereinstimmung mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (veranlasst im Jahre 2006) und wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

2.1.2 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Geräte sowie ihre Bezugsquellen sind jeweils unter den einzelnen Methoden aufgeführt. Standardgerätschaften und Einweg-Verbrauchsmaterialien sind nicht gesondert aufgeführt. Sofern nicht anderweitig vermerkt, wurden die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Sigma, Roth, Merck, Calbiochem, Peqlab, Applichem, Invitrogen und Roche.

2.1.3 Lösungen

2.1.3.1 Lösungen Molekularbiologie

50x TAE-Stammlösung:	40 mM Tris-Base, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA; pH 8,0 mit HCl
----------------------	--

10x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 mit NaOH, steril filtriert und autoklaviert
--	--

2.1.3.2 Lösungen Elektrophysiologie

Präparationslösung:	2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM PIPES, 10 mM D-Glukose, 200 mM Saccharose, 0,5 mM CaCl ₂ , pH 7,35 mit NaOH
Artifizierter cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF):	125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 25 mM NaHCO ₃ , 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ und 25 mM D-Glukose, pH 7,4 mit 95% O ₂ /5% CO ₂
Badlsg. für Cav-Messungen:	110 mM NaCl, 20 mM CsCl ₂ , 2 mM BaCl ₂ , 10 mM HEPES, 1 mM MgCl ₂ , 10 mM Glukose und 10 µM TTX, pH 7.35 mit NaOH
Standard-Pipettenlösung:	60 mM KCl, 65 mM K-Glutamat, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl ₂ , 3 mM K ₂ ATP, 0,2 mM Na ₂ GTP und 5 mM HEPES, pH-Wert 7,4 mit KOH
Pipettenlsg. für Cav-Analyse:	180 mM N-methyl-D-Glucamin, 40 mM HEPES, 4 mM MgCl ₂ , 12 mM Phosphokreatin, 2 mM Na ₂ ATP und 0,5 mM Na ₃ GTP, pH 7,3 mit H ₂ SO ₄
Pipettenlsg. für SK Kanal-Analyse:	135 mM K-Glutamat, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 0,1 mM EGTA, 2 mM MgCl ₂ , 0,1 mM Li ₂ GTP, 5 mM Na ₂ ATP, pH 7.35 mit KOH
Gabazin-Stock:	10 mM Gabazin in <i>aqua dest.</i>
CGP-Stock:	10 mM CGP in <i>aqua dest.</i>
AP-5-Stock:	20 mM AP-5 in <i>aqua dest.</i>
NBQX-Stock:	5 mM NBQX in DMSO
TTX-Stock:	3 mM MTTX in <i>aqua dest.</i>
Isradipin-Stock:	20 mM Isradipin in DMSO
Mibefradil-Stock:	10 mM Mibefradil in <i>aqua dest.</i>
Z944-Stock:	10 mM Z944 in DMSO
Apamin-Stock:	10 mM Apamin in <i>aqua dest.</i>
NS309-Stock:	20 mM NS309 in DMSO
Rotenon-Stock:	1 mM Rotenon in DMSO

Die DMSO-Endkonzentration in der Messlösung überschreitet jeweils nicht 5 % (v/v).

2.1.3.3 Lösungen Immunhistochemie

4% Paraformaldehyd:	4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4
10% Triton X-100:	10 ml Triton-X in 90 ml 0,1 M PB-Puffer
Blocker-Lösung:	10% (v/v) Pferdeserum, 0,2% (w/v) BSA, 0,5% (v/v) Triton-X Stock in PBS
Träger-Lösung:	1% (v/v) Pferdeserum, 0,2% (w/v) BSA, 0,5% (v/v) Triton X- 100 Stock (10%) in PBS
Aufbewahrungs-Lösung:	10% (w/v) Saccharose, 0,05% (v/v) NaN_3 in PBS
0,1 M PB-Puffer:	22 mM NaH_2PO_4 und 77 mM Na_2HPO_4 in <i>aqua dest.</i> , pH 7.4.

2.1.4 Enzyme/ Antikörper/ dNTPs

Primär-AK Schaf Anti-TH:	Chemicon, Katalognr. AB1542; 1:120
Primär-AK Kaninchen Anti-TH:	Calbiochem, Katalognr.: 657012; 1:1000
Sekundär-AK Kaninchen Anti-Schaf, biotinyliert:	Vector Laboratories, Katalognr. BA6000
Sekundär-AK Esel Anti-Kaninchen, biotinyliert:	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Katalognr.: 711-065- 152
Sekundär-AK Pferd Anti-Kaninchen Alexa 568:	Invitrogen, Katalognr.: A11011
Sekundär-AK Esel Anti-Kaninchen Alexa 488:	ThermoFischer Scientific, Katalognr.: R37118
Streptavidin/Alexa 488:	Invitrogen, Katalognr.: S11223
dNTP-Mix:	Peqlab, Katalognr.: 01-1000
Taq Gold Polymerase:	ThermoFischer Scientific, Katalognr.: 4338856
Superscript II Reverse Transkriptase:	Invitrogen, Katalognr.: 700662

2.1.5 Oligonukleotide

Alle PCR-Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Invitrogen in entsalzter und lyophilisierter Form bezogen. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 μM in RNase-freiem *aqua dest.* aufgenommen. Diese Primer-Stocklösungen wurden für die PCR-Reaktionen im Verhältnis 1:10 verdünnt und als Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Die 10 fach konzentrierten Random-Hexamer-Primer wurden von Roche bezogen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Gewinnung von LC Neuronen für die Expressionsanalyse

Zur Gewinnung einzelner LC Neurone wurden zunächst Hirnschnitte in einer Dicke von 220 μM , wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, hergestellt. Schnitte, die den LC enthielten, wurden zunächst für 30 Minuten in Carbogen begaster ACSF inkubiert und anschließend in die Messkammer des Patch- Clamp Messstandes transferiert. Es wurde sichergestellt, dass alle verwendeten Materialien, Lösungen und Geräte RNase-frei waren. Unter visueller Kontrolle wurden einzelne Neurone mittels Borosilikatkapillaren des Typs GB 150TF-8P (Science Products, Hofheim, Deutschland), welche mit PBS (sterilfiltriert) befüllt waren, aus dem Gewebeverband isoliert. Eine optimale Öffnung der Kapillaren wurde durch Nachbearbeitung mit der *Microforge* MF-830 (Narishige Group, Japan) gewährleistet. Durch Abbrechen der Kapillarspitze und Anlegen von Überdruck wurden die gesammelten Neurone kontrolliert in ein Reaktionsgefäß überführt und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Pro Reaktionsgefäß wurden 20 – 30 Neurone vereinigt und ein Gesamtvolumen von 200 μl wurde nicht überschritten.

2.2.2 RNA-Isolation

Um die Gesamt-RNA aus den gesammelten Neuronen zu gewinnen wurde zunächst ein Reaktionsgefäß mit 200 μl Neuronen auf Eis aufgetaut und 400 μl Lysepuffer (Roche) zugegeben. Die RNA wurde mittels des „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche) nach Anleitung des Hersteller durch Bindung der Nukleinsäuren an eine Säule und anschließende Waschschrte aufgereinigt. Die RNA wurde dann mit 15 μl *aqua dest.* in ein RNase-freies Reaktionsgefäß eluiert.

2.2.3 RT-Reaktion

Zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) mittels der Reversen Transkriptase (RT), wurden 15 µl der RNA Lösung zunächst mit 10fach konzentrierten Random-Hexamer-Primern gemischt und 10 min bei 70°C denaturiert. Die Reverse Transkription wurde dann in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 50 min bei 42 °C durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 5 µl 5fach RT-Erststrangpuffer, 6 µl 2 mM gemischte dNTPs, 2,5 µl 0,1 µM DTT und 1 µl 200 U/µl Superscript II Reverse Transkriptase. Das Enzym wurde anschließend 10 min bei 70 °C inaktiviert. Die Erststrang-cDNA wurde bei -20°C gelagert und direkt zur PCR-Amplifikation eingesetzt.

2.2.4 RT-PCR

Die Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) diente in dieser Arbeit der selektiven *in vitro* Anreicherung der zuvor aus mRNA synthetisierten Erststrang-cDNA. Durch das wiederholte Denaturieren, Anlagern von Primern und DNA-Doppelstrang-Synthese wird die in der RT Reaktion hergestellte cDNA bei diesem Verfahren exponentiell vermehrt und kann dann mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

2.2.4.1 Auswahl der Primer-Sequenzen

Um sicherzustellen, dass nur die aus der isolierten mRNA gewonnene cDNA und nicht genomische DNA amplifiziert wurde, wurden alle Primer-Paare intron-überspannend konzipiert. Die jeweiligen zur Primer-Konzeption benötigten cDNA Sequenzen wurden anhand der *Accession*-Nummer der entsprechenden Datenbank entnommen (genebank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Durch anschließenden Homologievergleich der Primersequenzen mit entsprechenden cDNA Datenbanken (Blast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) wurde die spezifische Hybridisierung überprüft. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten PCR-Primer.

Name	Sequenz 5' – 3'	Amplifikatgröße [bp]
mGAPDH - for	ACTTCAACAGCAACTCCCACTCT	110
mGAPDH - rev	GCTGTAGCCGTATTCATTGTCATA	110
mTH – for	GCTGTTCTCAACCTGCTCTTCTC	109
mTH - rev	GGGTCTCTAAGTGGTGGATTTTG	109
mDbh - for	ACTATGTGCACTACTACCCCAAGA	110
mDbh - rev	CTCCTCACTGCTGAACCTGTTTAC	110
mGAD1 - for	GGAGCGGATCCTAATACTACCAA	109
mGAD1 - rev	GTAAGAAGCCACAGATCTTCAGG	109

mGAD2 - for	CAGTGTTACAGCTCTCCTGGTTAG	109
mGAD2 - rev	TGTCATAGGACAGGTCATAGTGCT	109
mCav1.1 - for	GAGGATGACAACAACACTCTGAAC	109
mCav1.1 - rev	ATAGGAAGCCGTAGGCTATGATCT	109
mCav1.2 - for	CAGTCTCTCCTCACTGTGTTTCA	109
mCav1.2 - rev	AGACTAACATCCCTGGAAAAGAGG	109
mCav1.3 - for	GTTAGTCTGATCATCCTTGGCTCA	111
mCav1.3 - rev	CTGGAAATCTCCACGAGCTTTAG	111
mCav1.4 - for	CTCATTGTAGTGGGCAGTGTAGTC	111
mCav1.4 - rev	GCGAAAGAACGTGATAGATATGC	111
mCav2.1- for	GACCTATGGAACATTCTGGACTTC	111
mCav2.1 - rev	GACTCGGAGAGACTTAATGGTGTT	111
mCav2.2- for	TCTTCTACGTGGTCTACTTTGTGG	110
mCav2.2 - rev	GCATTGAGACATCACCTTATCTCC	110
mCav2.3- for	TCACAGGAGTGTTCACCTTTGAGA	110
mCav2.3 - rev	TACTACAAAGTCCAGGATGTTCCA	110
mCav3.1- for	GTTTTCTTCTACTTGAGCCAGGAC	111
mCav3.1 -rev	CACACAGTTGAGGAGAATAACCAG	111
mCav3.2 - for	GGAACATGTGCTCTTCAACCTG	109
mCav3.2 - rev	AGGTGGGTAGATGTCTTATCCTCA	109
mCav3.3 -for	TGATTGATGTGTACAAGCCTGACT	110
mCav3.3 -rev	GTGAGCAATAATGGTCTGACACAG	110
mSK1- for	GAGAAACACGTGCACAACTTCAT	110
mSK1 - rev	AGCCTGGTGTGTTGTAGATGAG	110
mSK2- for	GAATGACCAAGCAAATACCCTAGT	111
mSK2 - rev	GTGACGATCCTTTCTCAAAGTCT	111
mSK3- for	GAAAAGAGAAAGCGACTGAGTGAC	111
mSK3 - rev	CATGGAATCCTTTGAGTACAAACC	111
mSK4- for	GAACAAGTGAATTCATGGTGGAC	110
mSK4- rev	AGACCGTCGATTCTCTTCTCCAG	110
mBK – for	CTTGCCAGAGTCAAGATAGAGTCA	111
mBK - rev	GATGGAGATCACTCTCATGATGTT	111
mKv1.1 -for	AACCTAGCCTCTGACAGTGACCTC	112
mKv1.1 - rev	CCTGTCTGTAATGGGCTATGCTAT	112
mKv1.2- for	ACTGTAGGCTATGGAGACATGGTT	112
mKv1.2 - rev	ACACTATGACAGGGACTGGTAAGG	112
mKv1.3 - for	GTGACCATAGGAGGCAAGATTGT	111
mKv1.3 - rev	CCGGTGGTAGAAGTAGTTGAAGTT	111
mKv1.4 -for	GTGTGGTGATAAATGTGTCTGGTC	111
mKv1.4- rev	GGTCGAAGTACTGAGTCTCTTCT	111
mKv1.5 -for	CTTCATCGGAGTCATCCTCTTCT	111
mKv1.5- rev	ATAGTGACTACTGCCACCAGAAT	111
mKv1.6 - for	CTCTTTTCCAGCGCTGTCTACTT	110
mKv1.6 - rev	TAACCTACCGTGGTCATTGTAACC	110
mKv2.1 - for	CTGTGCTGAGAAGAGGAAGAACT	112
mKv2.1 - rev	AATGGTGGAGAGGACAATGAAC	112
mKv4.2 - for	GATCTACCACCAAAACCAACGAG	112
mKv4.2 - rev	CTTGCTCTGCATGTAGGCATTTG	112

mKv4.3 k+l - for	CTGTGATGTTTTATGCTGAGAAGG	110
	CATGTCTCCATATCCCAGTGTAGT	110
mKv4.3 l - for	AGACCACTGGGTTATCCTATCTTG	110
	CATGCAGTTCTGCTCAAACATCT	110
mERG- for	GCTTACTGCCCTCTACTTCATCTC	111
	TATAGGTTCCAGAGGCTCTCCAAAG	111
mKvß1- for	GTCTCCACTTGCTTGTGGAATTAT	110
	CACTTACGATTCTTTCTTCAACC	110
mGIRK1- for	ACCAACTTGAAGTGGATGTAGGTT	111
	ATAGGTCATAGAAGGGGCTTTTG	111
mGIRK2 -for	CCTCAACCAGACTGATATCAACG	109
	CCAGAAGGGACTCTGTTGGTTAAT	109
mGIRK3 - for	GATGAGAAGGTGGAGGAAGAAGG	111
	TCACACCTTGGACTCACTCTCTG	111
mGIRK4 - for	AGAAGGAATGGTAGAAGCAACAGG	109
	CTTTCCAAGGTGAGAACTGGTGT	109
mTASK-1 -for	TATTACTACTGCTTCATCACCCTCA	110
	ACGAAGCTGAAGGCCACATACT	110
mTASK-2 - for	CTATTCCTTCATCACCATCTCCAC	110
	AGATCCAAAGCTCCACAAAGTATC	110
mTASK-3 - for	CTTCTGTATGTTCTACGCTGTGCT	111
	TTCTTGATACGTTTCAGCAGGTAG	111
mTASK-5 - for	CTTCGCAGGCTCCTTCTACTTC	109
	GAGGGCATAGAACATGCAGAAC	109
mTHIK-1 - for	ACAGTGGTTTCTACCATAGGGTTT	110
	AAGAAGAGGATGGTACTTGACAT	110
mTHIK-2 - for	ACCATAGGTTTCGGCATGACAAC	107
	AAGAGGTTGAAGAACAAGATGGTC	107
mTWIK-1 - for	TTACTTCTGTTTCATCTCCCTGAG	109
	GTAACACGTGATTCCGATCTTGTA	109
mTWIK-2 - for	CTTCATCTCTGTCCACCATTG	108
	AGGAAGAGGTACGCTGTGACAAG	108
mTWIK-3 - for	TTAGCAGTAGAGACCTTCTCAGAGC	103
	CTAGGATGCCATCTTGATCTTCAT	103
mTREK-1 - for	GACGAACTCATCCAGCAAATAGTG	108
	AAAGAAGAAAGAGCTTCCGAGGTC	108
mTREK-2 - for	GGCAGAATTCTTGAGAGATCACAT	110
	AAGAGTTTCCTACTGGGCTGACT	110
mTRESK - for	ACAGTGTTCCAGCACAGTGGGTTAT	108
	GACCAGGAACATTAGAGGGATTCT	108
mTRAAK - for	TGACTCTCACCCTGTAGGCTTTG	108
	CTAGGCCAAACAAGATCCAGAAC	108
mTALK-1 - for	GTTTATCACCTCAGCACCATT	106
	GAGGATCCATATAGCTGCCAAG	106

Tabelle 2.1: Sequenzen und Amplifikatgrößen der verwendeten PCR-Primer.

2.2.4.2 Standard PCR-Protokoll

Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Für den Reaktionsansatz wurden folgende Volumina eingesetzt:

10 fach PCR-Puffer	2 µl
2 mM dNTP-Mix	2 µl
10 µM Primer for	2 µl
10 µM Primer rev	2 µl
DMSO	0.8 µl
5 U/µl Taq Gold Polymerase	0.12 µl
<i>Aqua dest.</i>	10.28 µl
cDNA	0.8 µl

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 5 min auf 96 °C erhitzt, gefolgt von 40 Zyklen bei 96 °C für 30 s, 58 °C für 30 s und 72 °C für 45 s.

2.2.4.3 Agarose - Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden die DNA-Proben in 5 %igen NuSieve 3:1 Agarose- (Lonza, Rockland, USA) Gelen in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die NuSieve-Gele wurden nach Anleitung des Herstellers vorbereitet und bei 4°C gelagert. Um eine Visualisierung der DNA unter UV-Licht zu ermöglichen wurden die Gele vor dem Erkalten der Agarose mit jeweils vier Tropfen Ethidiumbromid (Konzentration: 250 µg/ml) aus einer „dropper bottle“ (Roth) versetzt und durch Schwenken gemischt. Die DNA wurde vor dem Auftragen auf das Agarose-Gel mit 3 µl Gelladepuffer („6x DNA loading dye“, Fermentas) gemischt, als Längenstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter (Peqlab). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer angelegten Spannung von 90 mV über 25 Minuten. Zur Dokumentation wurden die Gele auf einem UV-Transluminator (BXT-20.M, UVIttec) fotografiert und ausgedruckt (DP-CF-011.C, VilberLourmat).

2.2.4.4 Aufreinigung und Verifizierung der PCR-Produkte

Zur Verifizierung der Primer Spezifität wurde mit jedem Primerpaar eine Kontroll-PCR mit cDNAs entsprechender Gewebe (Gehirn, Auge, Skelettmuskel) durchgeführt. Nach der Auftrennung der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des „Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration der

gewonnenen DNA-Lösung wurde mit dem UV-Spektrometer Genequant (PharmaciaBiotech) bestimmt, wobei die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ gemessen wurde. Zur Probenvorbereitung für die von der Firma Seqlab durchgeführten Sequenzierungen wurden 600 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 7 μl mit 20 pmol des entsprechenden Primers gemischt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Chromas Lite 2.0 (Technelysium). Anschließend erfolgte ein computergestützter Homologievergleich mit entsprechenden cDNA Datenbanken (Blast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.3 Elektrophysiologische Methoden

2.3.1 Präparation akuter Hirnschnitte

Die Mäuse wurden zunächst nach Feststellung der Reflexfreiheit in tiefer Isofluran-Narkose mit einer Schere dekapitiert. Anschließend wurde der Schädel durch einen Schnitt entlang der Sutura Sagittalis eröffnet und das Gehirn in die 0 °C kalte Präparationslösung überführt. Die hohe Zucker- und Magnesiumkonzentration der Präparationslösung soll den metabolischen Stress der Neurone während der ischämischen Präparationsphase herabsetzen. Auf der Rückseite einer gekühlten Petrischale wurde dann das Frontalhirn mit einem koronaren Schnitt entfernt und der so erzeugte Hirnstammblock mittels Sekundenkleber auf dem Schneideblock fixiert. Die gesamte Präparation erfolgte auf Eis um eine schnelle Kühlung des Gewebes zu gewährleisten.

In der 0-4°C kalten Präparationslösung wurden anschließend koronare Hirnstammschnitte in einer Dicke von 200 – 220 μm mit den Vibratomen MA 752 oder 700 smz-2 plus (Camden Instruments, England) angefertigt. Pro Tier konnten generell 2- 3 Schnitte, die den LC enthielten, visuell identifiziert werden, welche in eine Inkubationskammer mit ACSF transferiert wurden. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Neurone zu gewährleisten und einen konstanten pH-Wert von 7,4 einzustellen wurde die ACSF kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂/5% CO₂) begast. Da diese *in vitro* Bedingungen das *in vivo* Milieu der Neurone imitieren, bleibt die Zellvitalität für bis zu fünf Stunden nach Präparation erhalten. Vor Beginn der elektrophysiologischen Messungen wurden die Hirnschnitte zur metabolischen Regeneration für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Diejenigen Hirnschnitte, die den LC auf Höhe der rostralen Pons und des vierten Ventrikels enthielten, wurden dann in die Messkammer transferiert und, wenn nicht gesondert aufgeführt, kontinuierlich mit ACSF superfundiert.

2.3.2 Der Patch-Clamp Messstand

Die elektrophysiologischen Messungen an Neuronen des LC im akuten Hirnschnitt wurden mittels der Patch-Clamp-Technik (Sakmann und Neher, 1984) durchgeführt. Aufgrund der Erschütterungsempfindlichkeit der Messungen befand sich der gesamte Messstand auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Des Weiteren wurde der Messstand durch die Platzierung in einem Faraday'schen Käfig und durch Erdung elektrisch von der Umgebung abgeschirmt.

2.3.2.1 Bildgebung

Die Visualisierung der LC Neurone erfolgte mittels der Zeiss AxioCamMRm Kamera (Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA), welche sich auf dem aufrechten Mikroskop Zeiss Examiner.D1 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) befand. Einzelne Neurone wurden mittels eines Wasserimmersionsobjektivs mit 40 facher Vergrößerung und 0.75 Phasenkontrast in Kombination mit der Infrarot-Videotechnik und differentiellm Interferenzkontrast (IR-DIC) (AxioVision, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) dargestellt. Die Durchführung der Patch-Clamp Experimente wurde am Monitor beobachtet.

2.3.2.2 Pipetten und Pipettenhalterung

Als Messpipetten dienten Borosilikatkapillaren mit Filament GB 150TF-8P (Science Products, Hofheim, Germany), welche mit Hilfe des Pipettenziehgerätes „DMZ-Universal Puller“ (Zeitz-Instruments, Deutschland) hergestellt wurden. Die Pipettenwiderstände betrugen 2 bis 5 MΩ. Als Ableit- sowie als Referenzelektrode diente ein chlorierter Silberdraht, welcher regelmäßig innerhalb einer 3 M KCl-Lösung rechloriert wurde. Zur präzisen Steuerung war die Pipettenhalterung mit integriertem Vorverstärker (CV203BU Headstage, Molecular Devices, LLC, USA) mit einem elektronischen Mikromanipulator (PatchMan NP2, Eppendorf AG, Deutschland) verbunden. Der Kontakt der Referenzelektrode zur Badlösung wurde über eine 150 mM K⁺-Agar-Brücke hergestellt, welche die Cl⁻ Diffusion verhindert und das Potenzial zwischen Referenzelektrode und Badlösung stabilisiert.

2.3.2.3 Applikationsverfahren

Die Applikation von Pharmaka erfolgte mittels eines vor Ort (Werkstatt für Feinmechanik der Universität Marburg) angefertigten Perfusionssystems, welches das schnelle Umschalten auf unterschiedliche Lösungen ermöglicht. Die jeweiligen Stocklösungen wurden in entsprechenden

Konzentrationen zu jeweils 50 ml Applikationslösung gegeben. Alternativ wurde eine Präinkubation des gesamten Gewebeschnitts durch Zugabe der gewünschten Pharmaka zu der externen ACSF durchgeführt.

2.3.2.4 Datenaufnahme

Zur Datenaufnahme aller elektrophysiologischen Messungen diente der Axopatch 200B Verstärker (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA). Die Daten wurden mit einer Digitalisierungsfrequenz von 10 kHz mit dem Analog/Digital-Wandler Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) aufgezeichnet und bei 1-5 kHz gefiltert. Des Weiteren wurde über den Verstärker vor Beginn jeder Messung das „Offset-Potenzial“, welches an Übergängen zwischen der Ableitelektrode, der Pipettenlösung, der Badlösung und der Referenzelektrode entsteht, ausgeglichen. Die Messdaten wurden mit dem Computerprogramm „Clampex 10.0“ (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) aufgezeichnet. Alle *Whole-Cell* Messungen erfolgten bei einem initialen Serienwiderstand von maximal 15 MΩ. War eine Veränderung des Serienwiderstandes von mehr als 20% während der Messungen zu beobachten, so wurden die Daten verworfen.

2.3.3 Durchführung der Patch-Clamp Messungen

Mittels unterschiedlicher Konfigurationen der Patch-Clamp Technik können entweder die Strom- oder Spannungsveränderungen eines Membranfleckes (*On-Cell*, *Inside-Out*, *Outside-Out*) oder der gesamten Zelle (*Whole-Cell*, *Perforated-Patch*) aufgezeichnet werden (Abbildung 2.1).

Innerhalb dieser Arbeit wurden Messungen in der *Whole-Cell* und der *Perforated-Patch* Konfiguration durchgeführt. Um diese Konfiguration zu etablieren muss jedoch stets zunächst der *On-Cell* Zustand erreicht werden. Hierzu wurde eine mit sterilfiltrierter Pipettenlösung gefüllte Messpipette in die Pipettenhalterung eingespannt und, um Kontaminationen der Pipettenöffnung zu verhindern, ein leichter Überdruck angelegt. Die Pipette wurde unter visueller Kontrolle mit Hilfe des Mikromanipulators an ein möglichst oberflächlich liegendes Neuron herangefahren, bis sich die Pipettenspitze und die Zellmembran in derselben Ebene befanden und eine leichte Eindellung der Zellmembran zu erkennen war. Durch vorsichtiges Anlegen von Unterdruck kam es dann schließlich zur Ausbildung eines Abdichtwiderstandes zwischen Messpipette und Zellmembran von mehreren GigaOhm, dem *Gigaseal*. Die Ausbildung des *Gigaseals* wurde anhand der Änderung der Stromantwort auf einen Testpuls verfolgt und durch das Anlegen einer negativen Spannung von bis zu -60 mV unterstützt. Die schnelle Kapazitätskomponente (C_{fast}) wurde mit Hilfe von Korrekturmechanismen des Verstärkers kompensiert (vgl. 2.3.4.3).

2.3.3.1 Die Whole-Cell Konfiguration

Um in die *Whole-Cell* Konfiguration zu gelangen wurde der Membranfleck unter der Messpipette durch vorsichtiges Saugen durchbrochen. Dieser Vorgang konnte durch Änderung der Stromantwort auf den Testpuls beobachtet werden, wobei die kapazitiven Ströme zunahen. Diese langsame Kapazitätskomponente (C_{slow}) wurde ebenfalls korrigiert (vgl. 2.3.4.3). Die Qualität des Zugangs zu der Zelle wurde über den Serienwiderstand (R_s), welcher in Serie zu dem Membranwiderstand liegt, beurteilt. Ein großer Serienwiderstand zeigt an, dass Membranfragmente in die Öffnung der Patchpipette gelangt sind und führt dazu, dass ein Teil des Kommandopotenzials bereits an ihm abfällt. Da so keine gute Spannungskontrolle der Zelle möglich ist, wurden nur Messungen mit einem R_s von höchstens 15 M Ω verwendet.

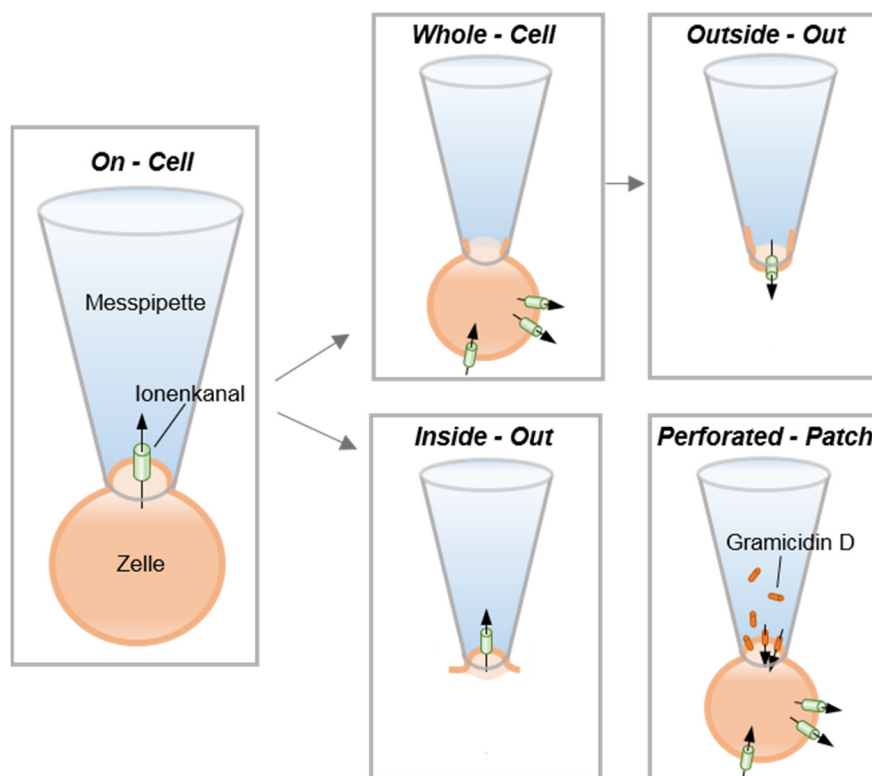


Abbildung 2.1: Konfigurationen der Patch-Clamp Technik.

Dargestellt sind die vier Standard-Konfigurationen der Patch-Clamp Technik: *On-Cell*, *Whole-Cell*, *Outside-Out*, *Inside-Out* sowie die *Perforated-Patch* Konfiguration mittels des porenbildenden Antibiotikums Gramicidin D.

2.3.3.2 Die *Perforated-Patch* Konfiguration

Die *Perforated-Patch* Konfiguration ist eine Variation der *Whole-Cell* Konfiguration, welche den Vorteil bietet, dass Gesamtzellableitungen möglich sind ohne intrazelluläre Signalmechanismen zu manipulieren. Sie beruht darauf, dass antibiotische Agenzien kleine Poren in der Zellmembran formen, durch die monovalente Ionen passieren können, während die Bewegung divalenter Ionen und größerer Moleküle verhindert wird (Kyrozis und Reichling, 1995). Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt um Auswascheffekte während langer Messungen der Spontanaktivität zu verhindern. Um die *Perforated-Patch* Konfiguration zu erreichen wurde der Pipettenlösung jeweils frisch vor der Messung 100 µg/ml Gramicidin D zugesetzt und durch Ultraschall gelöst. Die Messpipette wurde zu einem Drittel mit Gramicidin D-freier Pipettenlösung gefüllt und dann mit der Gramicidin D-Lösung aufgefüllt. Etwa zehn Minuten nach Etablierung der *On-Cell* Konfiguration konnte das Erreichen des *Perforated-Patch* Zustandes durch Auftreten langsamer kapazitiver Ströme (C_{slow}) festgestellt werden. Die Messung wurde begonnen, sobald der Serienwiderstand bis zu einem konstanten Wert abgesunken war. Messungen mit einem R_s größer als 30 MΩ wurden verworfen.

2.3.4 Messprotokolle

2.3.4.1 Die Spannungsklemme (*Voltage-Clamp*)

Die Spannungsklemme wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt um die durch Cav Kanäle oder SK Kanäle vermittelten Leitfähigkeiten der LC Neurone zu untersuchen. Dabei wurde die Stromantwort auf depolarisierende oder hyperpolarisierende Spannungssprünge und auf Spannungsrampen in der *Whole-Cell* Konfiguration analysiert.

Die Spannungsklemme beruht auf dem Funktionsprinzip des Patch-Clamp Verstärkers, dessen wichtigste Funktionseinheiten der Operationverstärker (OPA, *operational amplifier*) und der Rückkopplungswiderstand R_f sind. Der Zelle wird eine definierte Kommandospannung über den plus Eingang des OPA vorgegeben und zur gleichen Zeit die tatsächliche Spannung, die an der Messpipette anliegt, über den minus Eingang registriert. Entsteht hier durch das Öffnen von Ionenkanälen eine Spannungsdifferenz wird diese von dem OPA errechnet und hoch verstärkt an seinem Ausgang ausgegeben. Der so entstandene Unterschied zwischen der Spannung, die an der Messpipette anliegt, und der errechneten Differenzspannung bedingt, dass solange ein Kompensationsstrom über den Rückkopplungswiderstand R_f fließt, bis diese Differenz ausgeglichen ist. Da der Kompensationsstrom

und nicht der tatsächliche über die Zellmembran fließende Strom auf dem Monitor visualisiert wird, hat er die gleiche Größe, aber verläuft in die entgegengesetzte Richtung.

2.3.4.2 Die Stromklemme (Current-Clamp)

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Stromklemme in der *Whole-Cell* und der *Perforated-Patch* Konfiguration genutzt um die Spontanaktivität, Aktionspotenziale und das Ruhemembranpotenzial der LC Neurone zu analysieren. Im *Current-Clamp* wird der Strom, der über die Zellmembran fließt, vorgegeben und konstant gehalten. Der Verstärker arbeitet in diesem Fall ähnlich wie bei der Spannungsklemme, nur dass jetzt eine Ausgleichsspannung generiert und aufgezeichnet wird, die zur Spannungsänderung der Zelle proportional ist.

2.3.4.3 Kapazitätskorrektur

Die Kapazität ist als Ladungsmenge definiert, die benötigt wird, um das elektrische Potenzial eines Gegenstandes zu verändern. Bei jeder Spannungsänderung geht etwas Zeit für die kapazitive Umladung verloren. Neben der Kapazität des Vorverstärkers, welche durch zusätzliche Korrekturschaltkreise herabgesetzt wird, spielen die kapazitiven Eigenschaften der Patchpipette sowie der Zellmembran eine wichtige Rolle. Eine Änderung der Kommandospannung führt zunächst zur Umladung der Kapazitäten von Pipette und Zellmembran, bevor eine entsprechende Änderung des Membranpotentials erreicht wird. Als Antwort auf den Testpuls zeigen sich daher in der *On-Cell* Konfiguration schnelle, kapazitative Ströme von Pipette und Pipettenhalterung. In der *Whole-Cell* Konfiguration zeigen sich langsamere Umladeströme der Zellmembran. Da diese kurzzeitigen kapazitiven Ströme die eigentlichen Messsignale stören, wurden sie mit Hilfe zweier automatischer Korrekturmechanismen des Axopatch 200B Verstärkers ausgeglichen. Die spezifische Kapazität biologischer Zellmembranen beträgt für alle Zellen etwa $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Der Wert der langsamen Kapazität dient daher als direktes Maß für die Größe der untersuchten Zelle. Da entfernte Kompartimente in verzweigten Zellen wie Neuronen nur verzögert und unvollständig durch einen Spannungssprung umgeladen werden, ist diese Abschätzung hier jedoch ungenauer.

2.3.5 Datenanalyse

Zur Auswertung der elektrophysiologischen Messdaten wurde das Programm „Clampfit 10.3“ (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) verwendet. Die weitere Auswertung erfolgte mit den Softwareprogrammen „Office Excel 2007“ (Microsoft) und Igor (Wavemetrics, Michigan, USA).

2.4 Immunhistochemische Methoden

2.4.1 Perfusion, Präparation und Fixation der Hirnschnitte

Die Mäuse wurden in tiefer Ketamin/Xylazin-Narkose zunächst transkardial mit 0,1 M PB-Puffer, gefolgt von einer Fixationslösung bestehend aus 4% PFA in 0,1 M PB-Puffer, pH 7,4, perfundiert. Die Gehirne wurden vorsichtig entnommen und für 24 Stunden in der Fixationslösung postfixiert. Nach der Dehydratation in einer Isopropanol-Serie mit aufsteigenden Konzentrationen wurde das Gewebe in Paraplast Plus (Merck) eingebettet. Mittels eines Mikrotoms wurden Hirnschnitte in einer Dicke von 10 μ M angefertigt, welche in einem Wasserbad bei 45°C entknittert und anschließend auf silanisierte Objektträger aufgezogen wurden.

2.4.2 DAB-/Nickel-Färbung

Zur immunhistochemischen Analyse wurden die Hirnschnitte zunächst in Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Isopropanol-Serie rehydriert. Endogene Peroxidasen wurden durch eine 30 minütige Behandlung mit 0,1% (v/v) H₂O₂ in Methanol blockiert. Um eine optimale Antigen-Exposition zu gewährleisten, wurden die Hirnschnitte dann für 15 Minuten bei 92°C mit Natriumcitrat-Puffer behandelt. Anschließend wurde das Gewebe zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 Minuten in 0,3% (v/v) Triton X-100 in 0,1M PB-Puffer mit 5% (w/v) bovinem Serum Albumin (BSA) und in der Avidin-Biotin Blocklösung des Vectastain Elite ABC kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubiert. Die Inkubation mit dem primären anti-TH Antikörper (Spezies Schaf) (vergl. 2.1.3.3) erfolgte in 1% (w/v) BSA/PBS über Nacht bei 16°C, gefolgt von zwei Stunden bei 37°C. Immunreaktionen wurden mit einem biotinylierten anti-Schaf Zweitantikörper (vergl. 2.1.3.3) mittels der Vectastain ABC Methode (Vector Laboratories), welche Reaktionen des Chromogens 3,3-Diaminobenzidin (DAB) (Sigma) beinhaltet, detektiert. Die DAB-Reaktionen wurden durch Ammoniumnickelsulfat (Fluka) verstärkt. Das DAB-gefärbte Gewebe wurde schließlich wieder dehydriert, mit Deckgläschen und DePeX Medium (SERVA Electrophoresis) versiegelt und mit einem Olympus AX70 Mikroskop (Olympus Optical) analysiert.

2.4.3 Neurobiotin und Fluoreszenz-Färbung

Für die Neurobiotin-Experimente wurde der Pipettenlösung 0,1% (w/v) Neurobiotin zugesetzt, welches während der *Whole-Cell* Messungen in die jeweils gemessene Zelle diffundiert. Durch die Etablierung

der *Outside-Out* Konfiguration (vergl. 2.3.3) nach Beendigung der Patch-Clamp Messung wurde sichergestellt, dass die Zelle sich wieder verschloss und das Neurobiotin innerhalb der Zelle verblieb. Anschließend wurden die Schnitte in eine Fixationslösung bestehend aus 4% PFA und 15% Pikrinsäure in 0,1 M PB-Puffer transferiert. Nach der Fixation über Nacht wurde das Gewebe in einer Aufbewahrungslösung bestehend aus 10% Saccharose und 0,05% NaN_3 bei 4°C gelagert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde das Gewebe zunächst in 10% Pferdeserum in PBS und anschließend über Nacht mit dem primären anti-TH Antikörper (Spezies Kaninchen) inkubiert (vergl. 2.1.3.3). Als Zweitantikörper diente ein an das Fluorochrom Alexa 568 gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper (vergl. 2.1.3.3). Des Weiteren wurde eine Ko-Färbung mit dem an Streptavidin, welches das intrazellulär akkumulierte Neurobiotin bindet, konjugierten Fluorochrom Alexa 488 durchgeführt (vergl. 2.1.3.3). Die Ko-Lokalisationsanalyse wurde mittels eines Olympus IX71 Mikroskops, welches mit einem 60× N.A. 1.3 PL APO Objektiv (Olympus), standard EGFP Filter und „Texas red“ Filtern und einer gekühlten 12-bit CCD Kamera (SensiCamQE) ausgestattet war, durchgeführt. Die digitalen Bilder wurden mit der Software Image-Pro Plus 4.5 (MediaCybernetics) bearbeitet. Die Fluoreszenzfärbung dissoziierter Neuronenkulturen wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Als Zweitantikörper diente hier ein an das Fluorochrom Alexa 488 gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper. Die Bilder wurden mit einem Polychrom II Monochromator und einer IMAGO CCD Kamera (Till Photonics, Martinsried, Germany), die einem invertierten Mikroskop (IX70; Olympus, Hamburg, Germany) mit einem 20 x 0,8 (NA) Öl Immersionsobjektiv aufsaß, aufgenommen.

2.4.4 Stereologie

2.4.4.1 Gewebspräparation und Rotenon - Behandlung

Für die Rotenon- Behandlung wurden 20 Maus-Hirne zunächst wie für die elektrophysiologischen Experimente (vgl. 2.3.1) entnommen. Mittels des Vibratoms700 smz-2 plus (Cambden Instruments, England) wurde der kaudale Anteil des Hirnstamms in etwa auf Höhe -5,0 relativ zu Bregma durch einen koronaren Schnitt abgetrennt, so dass die kaudalste Region des LC freigelegt war. Jeweils fünf Hirnblöcke wurden zunächst für eine Stunde bei 30°C in carbogen-begaster ACSF mit oder ohne NS309 (20 μM), gefolgt von weiteren vier Stunden mit Rotenon (1 μM) inkubiert. Als Kontroll-Experiment wurden jeweils fünf weitere Hirnblöcke für fünf Stunden bei 30°C nur in ACSF oder ACSF mit NS309 (20 μM) inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mittels 4% (v/v) PFA in 0,1 M PB-Puffer, pH 7,4 für 48 Stunden fixiert und dann zur Kryoprotektion in eine 30 %ige (w/v) Saccharose-Lösung überführt. Mit einem Kryostat Mikrotom (Leica CM3050 S, Nussloch, Deutschland) wurden Schnitte in einer Dicke von 30 μm in einer SRS-Serie von vier ("systematically and randomly sampled", (Schmitz und Hof, 2005))

angefertigt. Dies ergab pro Tier vier bis fünf Hirnschnitte, welche den LC beinhalten. Diese wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C in einer Kryolösung, bestehend aus einem 1:1:3 Verhältnis von Ethylglycerol, Glycerol und 0,1 M PB-Puffer, gelagert.

Für die Immunhistochemie wurden die frei-schwimmenden Hirnschnitte zunächst zur Entfernung der Kryolösung dreimal mit 0,1 M PB-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die TH-positiven Neurone durch eine wie in Abschnitt 2.4.2 beschriebene DAB-Färbung sichtbar gemacht. Als Primärantikörper diente ein Anti-TH Antikörper aus der Spezies Kaninchen, als Sekundär-Antikörper ein biotinylierter Anti-Kaninchen Antikörper aus der Spezies Esel (vergl. 2.1.3.3). Die DAB-gefärbten Hirnschnitte wurden dann auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen, getrocknet und mittels eines „mounting Gels“ (Corbit-Balsam, Kiel, Germany) mit Deckgläschen versiegelt.

2.4.4.2 Bestimmung der Anzahl TH immunoreaktiver Neurone

Die Gesamtzahl Tyrosinhydroxylase positiver Neurone im LC wurde mittels der Software StereoInvestigator (v8, MicroBrightField, Magdeburg, Deutschland) und der „Optical Fractionator“ – Methode ermittelt. Diese Methode beruht darauf, dass eine randomisierte Serie relativ dicker Gewebeschnitte (SRS-Serie) wiederum randomisiert entlang der X, Y und Z-Achse in Objekte unterteilt wird. Durch Auszählen einer Teilmenge dieser Objekte und Extrapolation auf das Gesamtvolumen wird die Gesamtzahl der Neurone innerhalb der Interessensregion mathematisch abgeschätzt (Schmitz und Hof, 2005, West *et al.*, 1996). Das Auszählen wurde unter verblindeten Bedingungen durchgeführt. Auf jedem Hirnschnitt wurde zunächst jeweils die gesamte Region des LC bei 5facher Vergrößerung (Nikon Microphot-FX, Tokyo, Japan) mittels der Software begrenzt. Anschließend wurde das Programm mit den folgenden Informationen gespeist: Schnittdicke, hier 30 µM, Abstand der SRS-Serie, hier vier, und Gesamtanzahl zu zählender Schnitte, hier ebenfalls vier. Auf jede der zuvor eingegrenzten Regionen wurde dann ein Raster aus gleichförmigen Vierecken gelegt. Mittels eines motorgetriebenen Objektträgertisches wurden dann randomisiert einzelne Gesichtsfelder innerhalb dieses Rasters in 40-facher Vergrößerung auf dem Monitor abgebildet und mit einem rechteckigen Zählrahmen („*unbiased counting frame*“) bekannter Fläche überlagert. Ein individuelles, immunreaktives Neuron wurde gezählt, wenn (i) der Nukleus zu erkennen war, (ii) das Neuron innerhalb des Zählrahmens lag oder die grünen Inklusionslinien berührte und (iii) nicht die roten Exklusionslinien berührte (Abbildung 2.2).

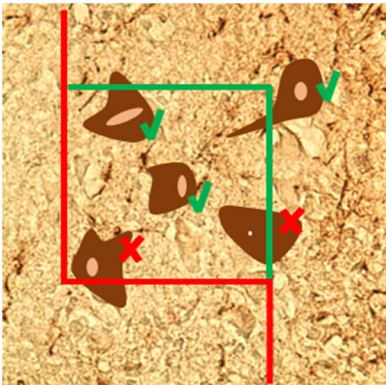


Abbildung 2.2: Zählkriterien zur Bestimmung der Anzahl TH-immunoreaktiver Neurone.

Dargestellt ist der schematische Ausschnitt eines Gewebeschnittes mit Tyrosinhydroxylase (TH) immunreaktiven Zellen (braun gefärbt). Bei der „Optical Fractionator“ – Methode zur Bestimmung der Gesamtzahl an Neuronen eines Hirnbereichs wird das Gesichtsfeld von einem rechteckigen Zählrahmen („unbiased counting frame“) überlagert. Die grünen Linien gelten als Inklusionslinien- ein Neuron, dass diese Linien berührt und dessen Nukleus zu erkennen ist wird gezählt (V)-, die roten Linien gelten als Exklusionslinien- ein Neuron, dass diese Linien berührt wird nicht gezählt (X).

2.5 Calcium- Messungen primärer LC Neurone

2.5.1 Primärkulturen

Primäre LC Neuronenkulturen wurden, wie in der Literatur beschrieben (Johnson *et al.*, 2008), aus postnatalen Mäusen (C57Bl/6j, P1-3) angefertigt. Zunächst wurde das Gehirn aseptisch entnommen und in eiskalte balancierte Salzlösung (HBSS), bestehend aus 130 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 0,4 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 0,3 mM Na_2HPO_4 , 5,5 mM Glukose, 0,4 mM MgSO_4 und 10 mM HEPES (pH 7.4), überführt. Anschließend wurden pro Tier 2-3 koronare Hirnstammschnitte, die den LC enthielten, in einer Dicke von 300 μm mittels des Vibratoms MA 752 (Camden Instruments, England) angefertigt. Zur Isolation der Neurone wurden die Hirnschnitte in ein Wachstumsmedium überführt, welches Neurobasal A, 2% (v/v) hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FBS), 1 mM Glutamin und 2% (v/v) B-27 Supplement (Invitrogen, San Diego, CA) enthielt. Die Regionen des LC wurden unter optischer Kontrolle mit Hilfe von zwei Pinzetten aus den Hirnschnitten herauspräpariert und die Neurone anschließend dissoziiert. Die primären Neurone wurden in mit Polyethylenimin beschichtete „ μ -Slide 8 Well“-Platten in Neurobasal A Medium, das mit 2% (v/v) B27, 2 mM Glutamin, 0,2 ng/ml „basic fibroblast growth factor“ und 2 ng/ml „fibroblast growth factor“ supplementiert war, ausgesäht. Pro „Well“ wurden die gesamten dissoziierten Zellen jeweils eines Tieres verwendet.

2.5.2 Calcium Imaging

Die primären neuronalen Zellen wurden mit 1-2 μM des ratiometrischen Farbstoffs FURA-2 AM (Fura-2-acetoxymethylester; TEFLABS, USA) für 30 Min bei 37°C in HEPES-Ringer Puffer, bestehend aus 136,4 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 2,2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 5 mM Glukose und 0.1% (v/v) bovinem

Serumalbumin, inkubiert. Alle eingesetzten Substanzen wurden in HEPES-Ringer Puffer gelöst (20 μM Glutamat, 1 μM Rotenon, 20 μM oder 1 μM NS309, 1 μM Apamin). Die Messungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration wurden mittels eines invertierten IX70 Mikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland) und der digitalen TILLvision Software (TILL Photonic's, Gräfelfing, Deutschland) durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten einzelner Zellen wurden nach Exzitation mit Wellenlängen von 340 und 380 nm gemessen, wobei mit Ca^{2+} gesättigtes FURA-2 AM bei 340 nm und freies FURA-2 AM bei 380 nm angeregt wird. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entsprach dem Verhältnis der Intensitäten der beiden Exzitationswellenlängen ($r = F_{340}/F_{380}$) nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz (Fluoreszenz eines zellfreien Areals). Die Emissionswellenlänge war 510 nm.

2.6 Statistische und weitere mathematische Auswertungen

Die in dieser Arbeit aufgeführten Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanzlevel wurden mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft) oder SPSS („Statistical Package for the Social Sciences“, IBM Corporation) bestimmt. Die Datensätze wurden mittels des Shapiro-Wilk Tests zunächst auf Normalverteilung getestet. In normal verteilten Datensätzen wurde die statistische Signifikanz mittels des gepaarten oder ungepaarten Student's T-Tests überprüft. Andernfalls wurden gepaarte Datensätze durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-signed-rank- Test und ungepaarte Datensätze mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Tests analysiert. Der p-Wert, welcher durch diese Tests ermittelt wird, gibt Aufschluss darüber, mit welcher Wahrscheinlichkeit die untersuchten Datensätze der gleichen Grundmenge entstammen. Die Signifikanz ist dementsprechend umso höher, je kleiner der p-Wert ist. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als Zeichen für Signifikanz angesehen und mit * markiert. Als weitere Signifikanzniveaus wurden $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) festgelegt.

Die Berechnung und Visualisierung von *Interspike*-Intervall Histogrammen erfolgte mit dem Programm Igor (Wavemetrics, Michigan, USA). Ausgleichskurven, die mittels mathematischer Modelle bestimmt wurden (Boltzmann-Kurven, exponentieller Abfall), und die daraus hervorgehenden Werte wurden mit dem Programm OriginPro7 (OriginLab, Northhampton, USA) ermittelt. Graphen wurden ebenfalls mit diesem Programm erstellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Identifikation und elektrophysiologische Charakterisierung von LC Neuronen im Hirnschnittpräparat

3.1.1 Immunhistochemische Identifikation

Die Region des LC wurde zunächst immunhistochemisch mittels der DAB/Nickel-Färbung als Ansammlung Tyrosinhydroxylase (TH) positiver Neurone im Hirnschnitt-Präparat identifiziert (Abbildung 3.1). TH-immunoreaktive Neurone befanden sich bilateral an den Rändern des vierten Ventrikels in Höhe -5,0 bis -6,0 relativ zu Bregma (Abbildung 3.1 A). In Konsistenz mit der in der

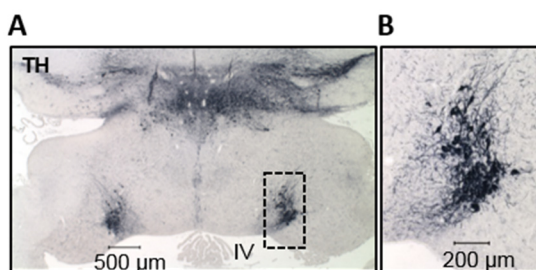


Abbildung 3.1: Identifikation der LC-Region im Hirnschnittpräparat anhand der Tyrosinhydroxylase-Immunoreaktivität.

(A) Hirnstamm Sektion einer juvenilen C57BL/6j Maus. Die Region des LC kann in der 4 fachen Vergrößerung bilateral am Rand des vierten Ventrikels (IV) anhand der Reaktivität für das monoaminerge Markerenzym Tyrosinhydroxylase (TH) identifiziert werden. TH-positive Neurone sind immunhistochemisch mittels DAB/Nickel schwarz gefärbt. (B) 10 fache Vergrößerung des in (A) markierten Ausschnittes. Die LC Neurone sind als dichte Ansammlung multi- und bipolarer Neurone mit mittelgroßen Somata zu erkennen.

Literatur beschriebenen Morphologie der LC Neurone (Schwarz und Luo, 2015) waren multipolare sowie bipolare Neurone mit Somata einer Größe von 20-30 µM identifizierbar (Abbildung 3.1 B).

3.1.2 Autonome Schrittmacheraktivität

Als Grundlage für die weiteren in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde zunächst eine generelle elektrophysiologische Charakterisierung des Aktivitätsmusters der LC Neurone juveniler C57BL/6j Mäuse vorgenommen. Abbildung 3.2 A zeigt ein typisches LC Neuron während eines Patch-Clamp Experiments. Um sicherzustellen, dass es sich bei den gemessenen Neuronen ausschließlich um noradrenerge LC

Neurone handelt, wurde die Pipettenlösung mit Neurobiotin versetzt. Da das Neurobiotin während der *Whole-Cell* Messungen in die Zelle diffundiert und dort im Anschluss an die Messung verbleibt, konnte die noradrenerge Natur jedes Neurons durch die spätere Ko-Färbung mit einem Anti-TH Antikörper verifiziert werden (Abbildung 3.2 B). Die autonome Aktivität der LC Neurone wurde in der *Whole-Cell* Konfiguration bei Raumtemperatur aufgezeichnet. Um zu gewährleisten, dass das autonome Aktivitätsmuster nicht durch synaptische Eingänge verändert ist, enthielt die Badlösung

(ACSF) Antagonisten Glutamaterger und GABAerger Rezeptoren (Williams *et al.*, 1984). Eine repräsentative AP-Folge ist in Abbildung 3.2 C illustriert. Ein durchschnittliches LC Neuron generierte APs mit einer Frequenz von $2,9 \pm 0,2$ Hz und einer Breite von $1,8 \pm 0,4$ ms bei halbmaximaler Amplitude sowie einer ausgeprägten Nachhyperpolarisation mit einer mittleren Amplitude von $29,8 \pm 1,7$ mV ($n = 86$) (Abbildung 3.2 C und Tabelle 3.1). Weitere Charakteristika des Aktivitätsmusters sowie die mittlere Membrankapazität als Maß für die Zellgröße sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

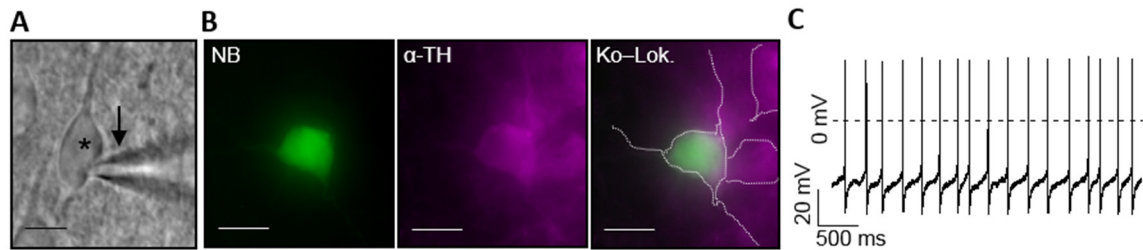


Abbildung 3.2: LC Neurone sind autonome Schrittmacher.

(A) Illustration einer Patch-Pipette (Pfeil), die sich einem LC Neuron (Stern) im Hirnschnittpräparat nähert. Maßstabsleiste: 20 µm. (B) Ko-Färbung eines mit Neurobiotin (NB) gefüllten Neurons mit Alexa488 konjugiertem Streptavidin (grün) sowie einem Anti-TH-Erstantikörper und einem Alexa568 gekoppelten Zweitantikörper (magenta). Die gestrichelten Linien verdeutlichen die Umrisse von drei TH-positiven LC Neuronen. Maßstabsleiste: 20 µm. (C) Repräsentative Messung eines spontanaktiven LC Neurons in der *Whole-Cell* Konfiguration während der Spannungsklemme. Zur Isolation der autonomen Aktivität wurde die ACSF mit Glutamatergen (AP-5, NBQX) und GABAergen (CGP, Gabazin) Blockern komplementiert.

<i>Eigenschaft</i>	<i>LC Neurone</i> (<i>n</i> = 86)	Tabelle 3.1: Elektrophysiologische Charakteristika spontanaktiver LC Neurone.
Kapazität [pF]	$55,6 \pm 1,8$	Die autonome Aktivität von 86 LC Neuronen wurde in der Spannungsklemme in der <i>Whole-Cell</i> Konfiguration aufgezeichnet. Die Kapazität diente als direktes Maß für die Größe des LC Neurons. Das Ruhemembranpotenzial wurde als mittleres Potenzial definiert um welches die Spannung im Verlauf der Aktionspotenzialabfolge fluktuierte. Als Schwellenpotenzial wurde die Spannung definiert, bei der das Aktionspotenzial in großer Vergrößerung einen abrupten Anstieg (oder Knick) zeigte (Bean, 2007). Die Aktionspotenzial-Breite wurde bei halbmaximaler Amplitude (APD50) abgelesen. Die Amplitude der Nachhyperpolarisation wurde aus der Differenz des jeweiligen Schwellenpotenzials und des maximal negativen Potenzials ermittelt.
Feuerrate [Hz]	$2,9 \pm 0,2$	
Ruhemembranpotenzial [mV]	$-43,1 \pm 0,9$	
Schwellenpotenzial [mV]	$-36,4 \pm 1,1$	
Aktionspotenzial-Höhe [mV]	$107,3 \pm 5,3$	
Aktionspotenzial-Breite [ms]	$1,8 \pm 0,4$	
Nachhyperpolarisation [mV]	$29,8 \pm 1,7$	
Max. negatives Potenzial [mV]	$-70,3 \pm 2,5$	

3.2 RT-PCR Expressionsanalyse der LC Neurone

Ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit war es, Ionenkanäle in LC Neuronen zu identifizieren, die das Aktivitätsmuster der Neurone beeinflussen und so potentielle Kandidaten zur Protektion vor aktivitätsabhängigem oxidativem Zellstress während der Pathogenese der Parkinson-Krankheit darstellen könnten. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine allgemeine Expressionsanalyse durchgeführt, welche die Ionenkanalfamilien der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv) (Abschnitt 3.2.2), der G-Protein-aktivierten einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanäle (GIRK) und Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle (K₂P) (Abschnitt 3.2.3), der spannungsabhängigen Calcium Kanäle (Cav) (Abschnitt 3.3.2) sowie der calcium-aktivierten Kaliumkanäle (SK) (Abschnitt 3.4.1) berücksichtigte.

3.2.1 Spezifität und Sensitivität der RT-PCR

In der Region des Locus Coeruleus befinden sich neben noradrenergen Neuronen außerdem GABAerge Interneurone (Aston-Jones *et al.*, 2004). Daher war es für die Expressionsanalyse essentiell eine Kontamination durch GABAerge Zellen auszuschließen. Im Methodenteil unter 2.2 wurde die in dieser Arbeit angewendete Technik der Gewinnung einzelner LC Neurone aus dem akuten Hirnschnitt mit anschließender mRNA-Isolation, reverser Transkription und PCR beschrieben. Diese Methode sollte

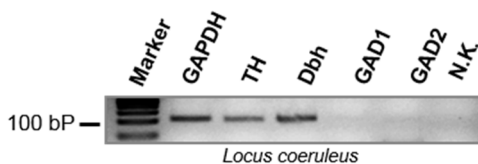


Abbildung 3.3: Markergen-Expression als Nachweis eines kontaminationsfreien LC Neuronen-„Pools“.

Repräsentative RT-PCR Expressionsanalyse von mRNA „gepoolter“ LC Neuronen, die aus akuten murinen Hirnschnitten isoliert wurden. Der Neuronenpool wurde für weitere Analysen verwendet, wenn Amplifikate der noradrenergen Markerenzyme Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin-beta-Hydroxylase (Dbh), nicht aber Amplifikate der Spleißvarianten des GABAergen Markerenzym Glutamatdecarboxylase (GAD) detektiert wurden. Das Stoffwechsel-Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Positivkontrolle, als Negativkontrolle wurde statt cDNA *aqua dest.* eingesetzt. (N.K.: Negativkontrolle)

gewährleisten, dass nur visuell als LC Neurone identifizierte Zellen in die Analyse einbezogen wurden. Da zur späteren Analyse jedoch etwa 30 Neurone vereinigt („gepoolt“) wurden und nicht ausgeschlossen werden konnte, dass in seltenen Fällen doch eine Kontamination stattfand, wurden molekulare Marker definiert, mit deren Hilfe die in der Probe vorhandenen Zelltypen in der PCR eindeutig bestimmt werden konnten. Als Marker für noradrenerge Neurone dienten die Schlüsselenzyme der Noradrenalin-Synthese, Tyrosinhydroxylase (Th) und Dopamin-beta-Hydroxylase (Dbh) (Benarroch, 2009). Die Spleißvarianten 1 und 2 der Glutamat-Dekarboxylase (GAD), das Schlüsselenzym für die Synthese von γ -Aminobuttersäure (GABA), wurden als neuronale Marker für GABAerge Neurone gewählt (Greif *et al.*, 1991).

Ein repräsentatives Agarosegel nach Auftrennung der PCR-Produkte ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Ausschließlich Neuronen-„Pools“, welche die noradrenergen Marker sowie das essentielle Stoffwechsel-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Positivkontrolle), aber nicht die GABAergen Marker exprimierten, wurden für weitere Analysen verwendet. Um des Weiteren eine ausreichende Sensitivität des hier verwendeten PCR-Protokolls zu überprüfen, wurden Kontroll-PCRs mit cDNA aus entsprechenden Geweben (Maus-Hirn, -Skelettmuskel oder –Auge) durchgeführt. Alle zu untersuchenden Transkripte wurden reproduzierbar nachgewiesen.

3.2.2 Expression spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Kv)

Kv Kanäle sind maßgeblich an der Repolarisation des Aktionspotenzials vieler neuronaler Zellen beteiligt und können so die intrinsische Schrittmacheraktivität spontanaktiver Neurone direkt beeinflussen (Hille, 2001). In einer jüngeren Studie konnte gezeigt werden, dass die Regulation der redox-sensitiven Kv-Kanal Untereinheit Kv4.3 eine gesteigerte AP-Rate dopaminergischer Neurone der SNpc im Parkinson-Modell bedingt (Subramaniam *et al.*, 2014). Mittels der in Abschnitt 2.2 und 3.2.1 beschriebenen RT-PCR-Analyse wurde daher ermittelt, welche Kv-Kanal Untereinheiten in Neuronen des LC exprimiert sind. Aus der Kv1 Ionenkanalfamilie konnten die Mitglieder Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 und 1.6 nachgewiesen werden (Abbildung 3.4 A). Weiterhin konnte der Kv2.1 Kanal sowie die lange und kurze Spleißvariante des Kv4.3 Kanals detektiert werden (Abbildung 3.4 B). Ein Transkript der Untereinheit Kv4.2 konnte nicht im LC nachgewiesen werden (Abbildung 3.4 B), war jedoch aus cDNA, die aus murinem Gehirn gewonnen wurde, amplifizierbar (Abbildung 3.4 C). Da akzessorische beta-Untereinheiten maßgeblich die Kinetik der Kv-Kanal vermittelten Ströme beeinflussen und zudem eine Redox-sensitivität in den jeweiligen Kanal einbringen können, wurde außerdem ein Primer-Paar entwickelt, das alle Kv beta-Untereinheiten (Kv β 1-3) erkennt. Wie in Abbildung 3.4 B illustriert, konnte das Kv β -Transkript in LC Neuronen detektiert werden. Als Negativkontrolle wurde jeweils anstatt der cDNA *aqua dest.* pipettiert.

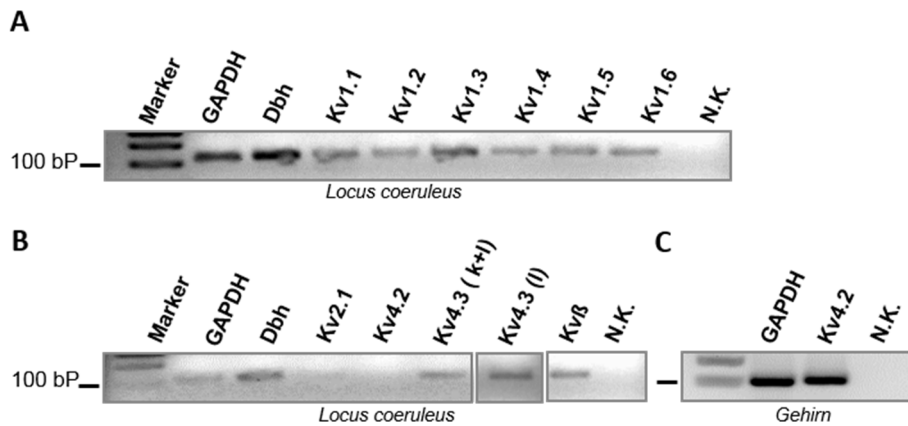


Abbildung 3.4: Expressionsprofil spannungsgesteuerter Kaliumkanäle in LC Neuronen.

RT-PCR Expressionsanalyse mittels intron-überspannender Primer, die PCR-Produkte mit einer Länge von 110-111 Basenpaaren erzeugten. GAPDH und Dbh dienten als Positivkontrolle. **(A)** Expressionsprofil der Kv1 Ionenkanalfamilie im Locus Coeruleus. **(B)** Kv2-, Kv4- und Kv β -Kanal Untereinheiten Expression im Locus Coeruleus. **(C)** Positivkontrolle für Kv4.2 aus cDNA, die aus murinem Gehirn gewonnen wurde. (GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Dbh: Dopamin-beta-Hydroxylase; N.K.: Negativkontrolle)

3.2.3 Expression weiterer Kaliumkanäle

Im Folgenden sollte überprüft werden, welche weiteren Untereinheiten kaliumselektiver Ionenkanäle, neben denen der Kv Kanäle, in LC Neuronen exprimiert sind. Abbildung 3.5 zeigt das mittels RT-PCR erstellte Expressionsprofil bezüglich der GIRK- und der K₂P-Kanäle. Innerhalb der GIRK Ionenkanalfamilie konnten Transkripte der Untereinheiten GIRK-1 sowie GIRK-4, nicht aber GIRK-2 und GIRK-3 nachgewiesen werden (Abbildung 3.5 A). Das Expressionsprofil bezüglich der K₂P Kanäle zeigte, dass TASK-1, TASK-3 und TASK-4 sowie THIK2, TWIK-1, TREK-1 und TRAAK in den analysierten LC Neuronen exprimiert waren (Abbildung 3.5 B und C).

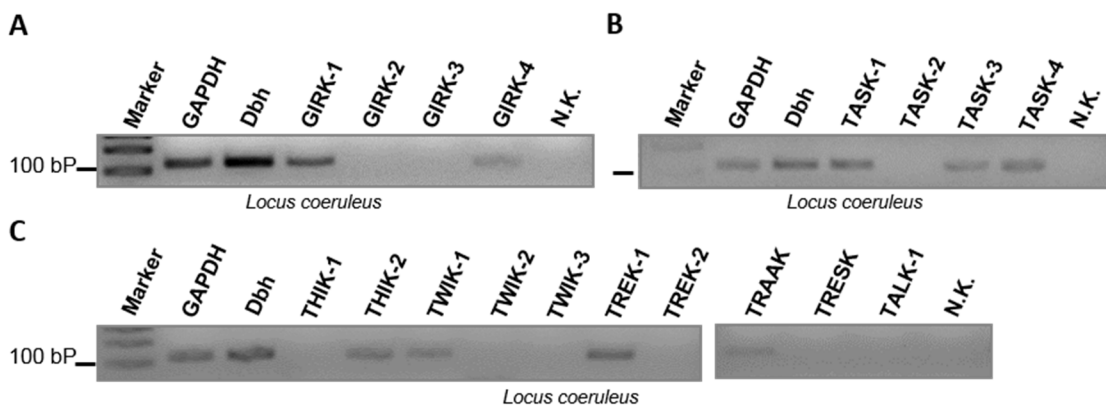


Abbildung 3.5: Expressionsprofil der GIRK Kanal und K₂P Kanal Untereinheiten in LC Neuronen.

RT-PCR Expressionsanalyse mittels intron-überspannender Primer wie in Abbildung 3.4 beschrieben. GAPDH und Dbh dienten als Positivkontrolle. **(A)** Expressionsprofil der GIRK Ionenkanalfamilie im Locus Coeruleus. **(B)** TASK Kanal Untereinheiten Expression im Locus Coeruleus. **(C)** Expressionsprofil weiterer K₂P Kanal Untereinheiten im Locus Coeruleus. (GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Dbh: Dopamin-beta-Hydroxylase; N.K.: Negativkontrolle)

3.3 Funktionelle Charakterisierung von L- und T-Typ Ca^{2+} -Kanälen in LC Neuronen

3.3.1 Identifikation einer „low-voltage“ aktivierten Ca^{2+} -Leitfähigkeit in LC Neuronen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte ich in meiner Diplomarbeit zeigen, dass LC Neurone im akuten Hirnschnittpräparat als Antwort auf depolarisierende Spannungssprünge Ca^{2+} Ströme generieren, deren Aktivierung schon bei negativen Membranpotenzialen beginnt (Matschke, 2011). Es wurde postuliert, dass Untereinheiten der Ca^{2+} Kanal Familien Cav1 oder Cav3 diese „low-voltage“ aktivierte Ca^{2+} Leitfähigkeit vermitteln könnten (Matschke, 2011). Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Expressionsprofil der Ca^{2+} Kanäle in LC Neuronen erstellt sowie eine funktionelle Charakterisierung vorgenommen. Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse wurden im Jahre 2015 im „*Journal of molecular and cellular neuroscience*“ veröffentlicht (Matschke *et al.*, 2015).

3.3.2 Expression spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle

Um die Hypothese zu überprüfen, dass LC Neurone funktionelle, LVA Ca^{2+} Kanäle exprimieren, wurden RT-PCR Analysen durchgeführt (vgl. Abschnitte 2.2 und 3.2.1). Die RT-PCR Experimente zeigten, in Übereinstimmung mit einer jüngeren Studie (Sanchez-Padilla *et al.*, 2014), die Expression der LVA L-Typ Ca^{2+} Kanal Untereinheit Cav1.3. Des Weiteren konnten Amplifikate der HVA L-Typ Ca^{2+} Kanal Untereinheit Cav1.2 nachgewiesen werden, während Cav1.1 und Cav1.4 nicht detektiert wurden (Abbildung 3.6 A). Als Positivkontrolle wurden die Untereinheiten Cav1.1 und Cav1.4 aus murinem Skelettmuskel beziehungsweise Auge amplifiziert (Abbildung 3.6 B). Auch die Transkripte der HVA Untereinheiten der Cav2 Subfamilie waren in LC Neuronen nachweisbar (Abbildung 3.6 C). Interessanterweise war außerdem die Expression der LVA T-Typ Ca^{2+} Kanal Untereinheiten Cav3.1, Cav3.2 und Cav3.3 nachweisbar (Abbildung 3.6 C).

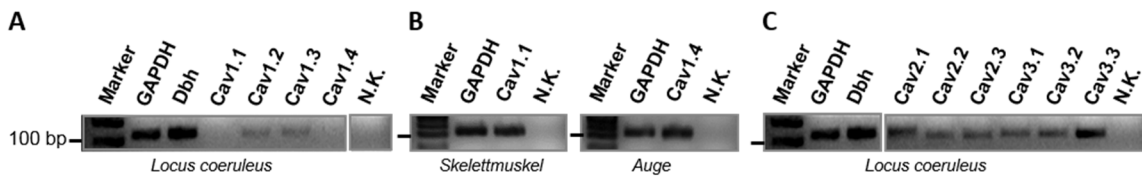


Abbildung 3.6: LC Neurone exprimieren Cav1, Cav2 und Cav3 Ca^{2+} Kanal Untereinheiten.

RT-PCR Expressionsanalyse von mRNA aus Hirnschnitten isolierter LC Neurone. Die intron-überspannenden Primer wurden so entworfen, dass PCR-Produkte mit einer Länge von 110 Basenpaaren entstanden. Das Stoffwechsel-Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und das noradrenerge Markerenzym Dopamin-beta-Hydroxylase (Dbh) dienten als Positivkontrolle. **(A)** Cav1 Untereinheiten Expressionsprofil im Locus Coeruleus. **(B)** Positivkontrollen für Cav1.1 und Cav1.4 aus cDNA, die aus murinem Skelettmuskel oder Auge gewonnen wurde. **(C)** Cav2- und Cav3 –Kanal Untereinheiten Expression im Locus Coeruleus. (Cav: spannungsabhängiger Ca^{2+} Kanal; N.K.: Negativkontrolle)

3.3.3 Identifikation L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelter Ströme in LC Neuronen

Zur Charakterisierung der durch L- und T-Typ Ca^{2+} Kanäle vermittelten Stromkomponenten von LC Neuronen in Patch-Clamp Messungen im akuten Hirnschnitt wurden die pharmakologischen Unterschiede dieser Ca^{2+} Kanal- Subtypen genutzt. Zur Isolation Cav1 vermittelter Ströme wurde das Racemat des Dihydropyridins Isradipin genutzt. Da das (-) Enantiomer inaktiv ist, lag der IC_{50} hier bei 24 nM (Ito *et al.*, 1997).

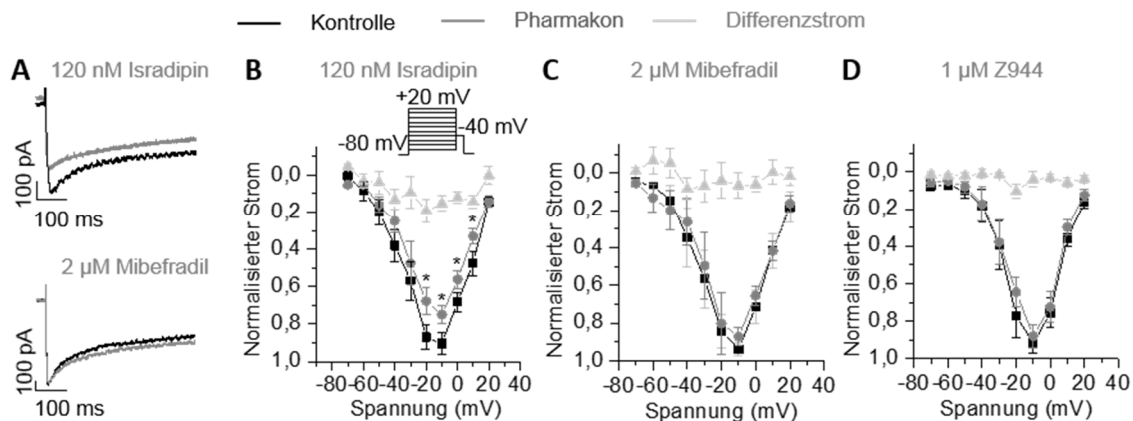


Abbildung 3.7: Pharmakologische Isolation L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelter Ströme.

Elektrophysiologische Messungen in der *Whole-Cell Voltage-Clamp* Konfiguration. Die Badlösung enthielt 2 mM BaCl_2 als Ladungsträger und wurde mit 1 mM TTX komplementiert. **(A)** Repräsentative Strommessungen bei einem Spannungssprung zu -10 mV ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV vor (schwarze Linie) und nach Applikation von 120 nM Isradipin (oben, dunkelgraue Linie) oder 2 µM Mibefradil (unten, dunkelgraue Linie). **(B-D)** Strom-Spannungsbeziehungen (I/V) abgelesen am Start des jeweiligen Testpotenzials (für das Spannungsprotokoll vergl. Einsatz in B). Der Strom jeder Messung wurde auf den jeweils maximalen Einwärtsstrom normalisiert. I/Vs der Kontrollmessungen sind als schwarze Linien gezeigt, die dunkelgrauen Linien illustrieren die I/Vs nach Applikation von Isradipin (B, n = 6), Mibefradil (C, n = 4) oder Z944 (D, n = 5). Die hellgrauen Linien illustrieren die I/Vs der Differenzströme errechnet aus den Strömen vor und nach Substanz-Applikation. **(A-D)** * bedeutet $P \leq 0,05$ mittels des "Wilcoxon signed-rank" Tests.

Zur Isolation von T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelten Stromkomponenten wurde einerseits Mibefradil verwendet, das Kanäle der Cav3 Familie mit einem IC_{50} von 200 nM blockiert (Klugbauer *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde der für T-Typ Ca^{2+} Kanäle spezifische Blocker Z944 mit einem IC_{50} im Bereich von 100 nM genutzt (Tringham *et al.*, 2012). Um die jeweiligen Ca^{2+} Kanal vermittelten Ströme auflösen zu können wurde die Badlösung mit dem Natrium- Kanal Antagonisten TTX und dem Kalium-Kanal Antagonisten Cäsium komplementiert. Als Ladungsträger wurde Ba^{2+} (2 mM) anstatt Ca^{2+} genutzt, da so auch kleine Ca^{2+} Kanal vermittelte Ströme auflösbar sind. In der *Whole-Cell Voltage-Clamp* Konfiguration wurde das Membranpotenzial zunächst ausgehend von einem Haltepotenzial bei -80 mV für 500 ms auf Membranpotenziale von -70 mV bis +20 mV depolarisiert. Als Antwort auf dieses Spannungsprotokoll wurden unter Kontrollbedingungen Einwärts- Ba^{2+} -Ströme mit einer maximalen Amplitude von -564 ± 58 pA bei -10 mV gemessen ($n = 9$) (Abbildung 3.7 A). Der repräsentative Strom (Abbildung 3.7 A, oben) sowie die Strom-Spannungsbeziehung (I/V) der normalisierten maximalen Ströme (Abbildung 3.7 B) illustrieren, dass die Applikation von 120 nM Isradipin (fünf mal höher als der IC_{50}) eine signifikante Stromreduktion in Spannungsbereichen zwischen -20 mV und +10 mV verursachte ($n = 6$). Im Gegensatz dazu verursachte die Zugabe von 2 μM Mibefradil zur Badlösung keine signifikante Reduktion der Stromamplituden ($n = 4$) (Abbildung 3.7 A, unten und Abbildung 3.7 C). Nach Applikation von 1 μM des spezifischeren T-Typ Ca^{2+} Kanal Blockers Z944 zeigte sich ebenfalls keine signifikante Reduktion der jeweiligen Strommaxima ($n = 5$) (Abbildung 3.7 D).

In meiner Diplomarbeit konnte ich durch Messungen, in denen ACSF als Badlösung genutzt wurde, zeigen, dass bei einem Haltepotenzial von -80 mV bereits 25 % der Ca^{2+} Kanäle inaktiviert sind (siehe Einleitung Abschnitt 1.2.4) (Matschke *et al.*, 2015, Matschke, 2011). Dies führte zu der Annahme, dass das zuvor beschriebene Spannungsprotokoll mit einem Haltepotenzial von -80 mV nicht geeignet sein könnte um T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelte Ströme zu detektieren. Deshalb wurde in den folgenden Ba^{2+} -Strom Messungen ein Protokoll verwendet, welches das Membranpotenzial direkt vor den Spannungssprüngen zunächst auf -100 mV hyperpolarisiert (siehe Einsatz in Abbildung 3.8 B). Das Anlegen dieses Spannungsprotokolls resultierte ebenfalls in ausgeprägten Einwärtsströmen mit einem Maximum bei -10 mV (Abbildung 3.8 A-D). Die repräsentativen Ströme bei einem Spannungssprung zu -30 mV illustriert in Abbildung 3.8 A zeigen jedoch, dass sowohl die Isradipin- als auch die Mibefradil-Applikation nun eine signifikante Stromreduktion bewirkten. Die I/Vs der normalisierten Strommaxima zeigen außerdem, dass Isradipin insbesondere eine Ba^{2+} Strom Komponente bei depolarisierten Membranpotenzialen von -20 mV bis +10 mV reduzierte ($n = 6$) (Abbildung 3.8 B). Mibefradil hingegen verursachte eine signifikante Stromreduktion bei hyperpolarisierteren Potenzialen von -40 mV bis -20 mV. Der Mibefradil-sensitive Differenzstrom (hellgraue Linie) erreichte sein Maximum bei einem Membranpotenzial von -30 mV ($n = 6$) (Abbildung 3.8 B).

In Übereinstimmung dazu führte auch die Applikation von Z944 primär zur Reduktion einer Stromkomponente, die bei negativen Membranpotenzialen aktiviert (Abbildung 3.8 C). Zur Bestimmung der Kinetik der Substanz-sensitiven Stromkomponenten aus Abbildung 3.8 A wurde der Strom nach Substanz-Applikation jeweils von dem dazugehörigen Kontrollstrom subtrahiert. Die Analyse ergab, dass der Isradipin-sensitive Differenzstrom (gezeigt in blau) langsam inaktiviert, während der Mibefradil-sensitive Differenzstrom (gezeigt in rot) schon innerhalb von 100 ms vollständig inaktiviert ist (Abbildung 3.8 E). Um die oben ermittelten Ergebnisse zu bestätigen, wurden in der *Voltage-Clamp* Konfiguration zusätzlich schnelle Spannungsrampen ausgehend von einem hyperpolarisierten Potenzial von -90 mV appliziert (Abbildung 3.8 F, links). Auffallend war, dass die Stromantwort unter Kontrollbedingungen (schwarze Linie) eine „Schulter“ bei etwa -40 mV zeigte, welche den Strom durch LVA Ca^{2+} Kanäle repräsentieren könnte, während das eigentliche Maximum nahe -10 mV lag (Abbildung 3.8 F und G, siehe Pfeile).

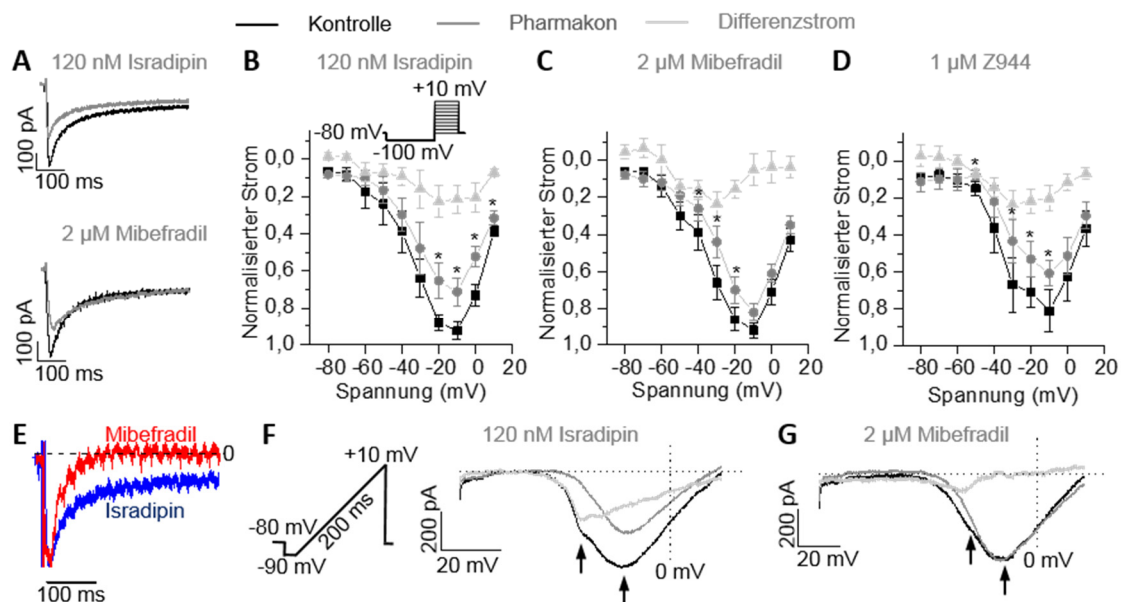


Abbildung 3.8: Pharmakologische Isolation L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelter Stromkomponenten.

Whole-Cell Voltage-Clamp Messungen mit 2 mM BaCl_2 und 1 mM TTX in der Badlösung. (A) Beispielmessungen der Ströme bei einem Spannungssprung zu -30 mV ausgehend von einem zuvor auf -100 mV hyperpolarisierten Membranpotenzial vor (schwarze Linie) und nach Applikation von 120 nM Isradipin (oben, dunkelgraue Linie) oder 2 µM Mibefradil (unten, dunkelgraue Linie). (B) I/V der normalisierten Einwärtsströme abgeleitet aus dem als Einsatz gezeigten Spannungsprotokoll vor (schwarze Linie) und nach Isradipin-Applikation (dunkelgraue Linie). Der Differenzstrom (hellgraue Linie) zeigte ein Maximum bei -10 mV ($n = 6$). (C-D) I/Vs der Ba^{2+} Ströme vor und nach Applikation von Mibefradil (C, $n = 6$) oder Z944 (D, $n = 5$). Der Mibefradil- sowie der Z944- sensitive Differenzstrom zeigte ein Maximum bei -30 mV (hellgraue Linie). (E) Repräsentative Isradipin-sensitive (blaue Linie) und Mibefradil-sensitive (rote Linie) Differenzströme abgeleitet aus A. Die Ströme nach Substanzapplikation wurden von dem jeweiligen Kontrollstrom subtrahiert und anschließend auf den maximalen Strom normalisiert. (F-G) Repräsentative Stromantworten auf eine Spannungsrampe, die das Membranpotenzial in 0,2 s von -90 mV auf +10 mV depolarisiert. Die Kontrollströme (schwarze Linie) zeigten zwei Stromkomponenten mit zwei Maxima (Pfeile). Isradipin reduzierte beide Stromkomponenten (F, $n = 7$), während Mibefradil selektiv die bei negativem Membranpotenzial aktivierende Stromkomponente reduzierte (G, $n = 5$). (A-G) * bedeutet $P \leq 0,05$ mittels des „Wilcoxon signed-rank“ Tests.

Isradipin reduzierte sowohl das Maximum bei -10 mV als auch die Stromkomponente bei hyperpolarisierteren Potenzialen ($n = 7$) (Abbildung 3.8 F, dunkelgraue Linie). Mittels dieser sehr stabilen Spannungsrampen konnte ein Isradipin-sensitiver Differenzstrom ermittelt werden, dessen Maximum nahe -40 mV lag (Abbildung 3.8 F, hellgraue Linie) und der auf eine Beteiligung von LVA L-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelten Strömen hindeutet. Die Mibefradil-Applikation hingegen hatte keinen Einfluss auf das Strommaximum bei -10 mV, sondern blockierte selektiv eine kleine Stromkomponente bei hyperpolarisierteren Potenzialen ($n = 5$) (Abbildung 3.8 G). Diese Ergebnisse bestätigen, dass sowohl L-Typ als auch T-Typ Ca^{2+} Kanäle zu der bei hyperpolarisierten Membranpotenzialen aktivierenden Ca^{2+} Leitfähigkeit in LC Neuronen beitragen.

3.3.4. Regulation der Feuerrate durch simultane Blockade von L- und T-Typ Ca^{2+} Kanälen

Um einen möglichen Einfluss der identifizierten LVA Ca^{2+} Leitfähigkeiten auf den intrinsischen Schrittmachermechanismus juveniler LC Neurone zu untersuchen, wurden AP-Folgen in der *Whole-Cell Current-Clamp* Konfiguration aufgenommen. War die Frequenz der spontan generierten APs für zwei Minuten stabil wurde die Badlösung (ACSF) gegen ACSF, die entweder Isradipin, Mibefradil oder Isradipin und Mibefradil enthielt, ausgetauscht. Die relativen Veränderungen der AP-Parameter wurden weitere zwei Minuten später analysiert. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte Artefakte des Lösungswechsels sind wurde auch bei den Kontrollmessungen ein Lösungsaustausch zu einem anderen ACSF enthaltenden Röhrchen durchgeführt. Weder die Applikation von 120 nM Isradipin noch von 2 μM Mibefradil führte zu einer Veränderung der Feuerrate (Abbildung 3.9 A-B). Die simultane Applikation der beiden Substanzen resultierte hingegen in einer Beschleunigung der AP-Frequenz (Abbildung 3.9 C). Die Quantifizierung der relativen Veränderung der Feuerrate zeigte, dass diese simultane Substanz-Applikation eine signifikante, 1,6 fache, Erhöhung der AP-Frequenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen verursachte (Abbildung 3.9 D). Eine erhöhte Feuerrate kann durch die Veränderung bestimmter AP-Parameter hervorgerufen werden: (i) eine Verschiebung des AP Schwellenwerts zu negativeren Potenzialen, (ii) eine Verschiebung des Ruhemembranpotenzials zu positiveren Potenzialen oder (iii) eine Verkleinerung der NHP Amplitude. Abbildung 3.9 E illustriert die Veränderungen des AP-Schwellenwerts in Relation zu dem jeweiligen Schwellenwert vor Substanz-Applikation (relatives Schwellenpotenzial). Das Schwellenpotenzial wurde als die Membranspannung definiert, bei der das AP in großer Vergrößerung einen abrupten Anstieg (Knick) aufwies (Bean, 2007). Weder Isradipin oder Mibefradil allein, noch die simultane Applikation beider Substanzen verursachten eine signifikante Verschiebung des Schwellenpotenzials (Abbildung 3.9 E). In vorherigen Studien wurde die Kopplung von Ca^{2+} Kanälen an Ca^{2+} aktivierte K^+ Kanäle (SK Kanäle) und ein daraus resultierender Einfluss der Ca^{2+} Kanäle auf die NHP Amplitude in Neuronen des ZNS beschrieben (Bean, 2007). Um zu

überprüfen, ob das Zusammenspiel von L- und T-Typ Ca^{2+} Kanälen die AP-Frequenz der LC Neurone indirekt durch Kopplung an SK Kanäle regulieren könnte, wurde der Einfluss der Substanzen auf die NHP Amplitude näher untersucht. Abbildung 3.9 F zeigt repräsentative Kontroll-APs (schwarze Linie) und APs desselben Neurons nach simultaner Applikation von Isradipin und Mibefradil (violette Linie). Wie in dem Einsatz verdeutlicht, führte die gleichzeitige Blockade von Cav1 und Cav3 Kanälen zu einer ausgeprägten Verkleinerung der NHP Amplitude. Die Quantifizierung der relativen NHP Amplitude ergab, dass diese Reduktion hochsignifikant war (Abbildung 3.9 G).

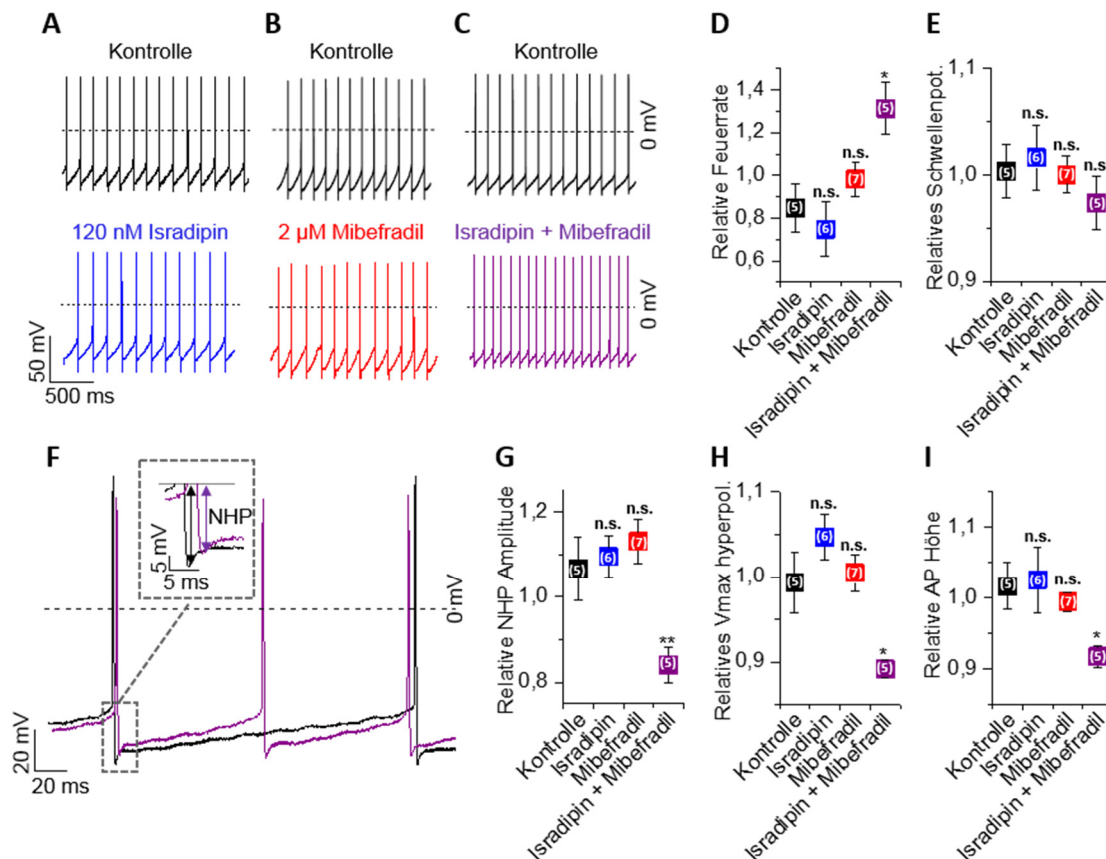


Abbildung 3.9: Die simultane Blockade von L- und T-typ Ca^{2+} Kanälen bedingt eine erhöhte AP-Frequenz.

(A-C) Repräsentative Aktionspotenzial-Abfolgen, aufgenommen in der *Whole-Cell Current-Clamp* Konfiguration. Die Badlösung (ACSF) wurde entweder mit (A) 120 nM Isradipin, (B) 2 μM Mibefradil oder (C) beiden Substanzen gleichzeitig versetzt. (D) Quantifizierung der Veränderung der Feuerrate. Für jede Messung wurde die AP-Frequenz 2 min nach Umschalten auf Substanz- oder Kontrolllösung in Relation zu der Frequenz direkt vor dem Lösungswechsel gesetzt. (E) Relative Veränderung des Schwellenpotenzials (Schwellenpot.) nach Substanz-Applikation. Das Schwellenpotenzial wurde als das Membranpotenzial definiert, bei dem das Aktionspotenzial in großer Vergrößerung einen abrupten Anstieg zeigte. (F) Überlagerung repräsentativer *Current-Clamp* Aufnahmen vor (schwarze Linie) und nach simultaner Isradipin/Mibefradil Applikation (violette Linie). Der Einsatz illustriert die Substanz-induzierte Veränderung der Nachhyperpolarisation (NHP) (Pfeile). (G) Relative Substanz-induzierte Veränderungen der NHP Amplitude. Die gleichzeitige Blockade von L- und T-Typ Ca^{2+} Kanälen führte zu einer signifikanten Verkleinerung der NHP. (H) Relative Veränderung des negativsten, während der NHP erreichten Potenzials (Vmax hyperpol.). Die simultane Substanz Applikation verschob das Vmax hyperpol. zu signifikant positiveren Membranpotenzialen. (I) Relative Veränderungen der Aktionspotenzial (AP) Höhe, errechnet vom Maximum bis zum Schwellenpotenzial. (Kontrolle, n=5; Isradipin, n=6; Mibefradil, n=7; Isradipin+Mibefradil, n=5). n.s.: Nicht signifikant, *, bedeutet $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$ kalkuliert mittels des ungepaarten Student's T-Tests oder im Falle nicht normalverteilter Daten mittels des Mann-Whitney U Tests.

In Übereinstimmung dazu war auch das negativste, während der Hyperpolarisation erreichte Potenzial signifikant zu positiveren Potenzialen verschoben (Abbildung 3.9 F und Abbildung 3.9 H). Des Weiteren führte die simultane Substanz-Applikation zu einer Reduktion der AP-Höhe (Abbildung 3.9 F und Abbildung 3.9 I). Dieser Effekt ist am wahrscheinlichsten durch die verringerte NHP Amplitude und der damit einhergehenden Depolarisation zu erklären, welche dann zur Inaktivierung von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen führen kann.

Um zu untersuchen, ob das beobachtete Zusammenspiel von Cav1 und Cav3 Kanälen ausschließlich ein Mechanismus juveniler LC Neurone ist, wurden die Experimente in älteren Mäusen (P35-P40) wiederholt. Vergleichbar zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen juveniler Neurone, führte die kombinierte Applikation von Isradipin und Mibefradil zu einer erhöhten AP-Frequenz und reduzierte die NHP Amplitude, das maximal negative Potenzial und die AP-Höhe (Abbildung 3.10 A-E).

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass das Zusammenspiel von L- und T-Typ Ca^{2+} Kanälen, wahrscheinlich durch Kopplung an SK Kanäle, die NHP Amplitude moduliert und so an der Regulation des intrinsischen Schrittmachermechanismus von LC Neuronen beteiligt ist.

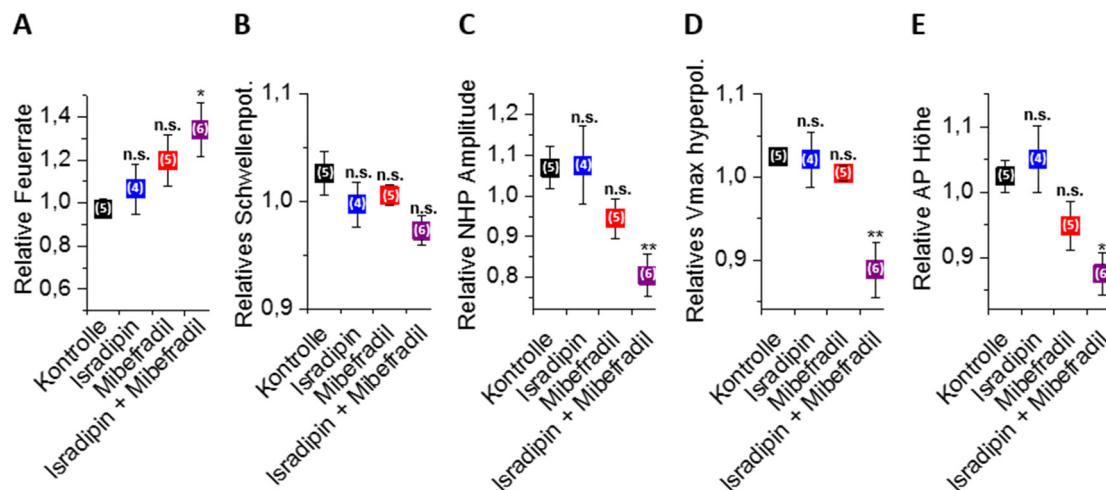


Abbildung 3.10: Die kombinierte L- und T-typ Ca^{2+} Kanal Blockade verändert auch das Feuerverhalten älterer LC Neurone.

Aktionspotenzialabfolgen von LC Neuronen älterer Mäuse (P35-P40) wurden in der *Whole-Cell Current-Clamp* Konfiguration aufgenommen. Relative Veränderungen der (A) Feuerrate und der (B-E) Aktionspotenzial Charakteristika nach Komplementierung der ACSF mit 120 nM Isradipin, 2 μM Mibefradil oder beiden Substanzen gleichzeitig (Kontrolle, n=5; Isradipin, n=4; Mibefradil, n=5; Isradipin+Mibefradil, n=6). Die Daten wurden in gleicher Weise wie in Abbildung 3.9 beschrieben analysiert. n.s.: Nicht signifikant, *, bedeutet $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$ kalkuliert mittels des ungepaarten Student's T-Tests oder im Falle nicht normalverteilter Daten mittels des Mann-Whitney U Tests.

3.4 Funktionelle Charakterisierung von SK Kanälen in LC Neuronen

In Abschnitt 3.3 wurde die funktionelle Expression von Cav Kanälen in LC Neuronen beschrieben, welche über die Modulation der Nachhyperpolarisation die Feuerrate der Neurone regulieren. Es wurde postuliert, dass diese Modulation über die Kopplung an Ca^{2+} aktivierte Kaliumkanäle zustande kommt (Matschke *et al.*, 2015). Im Folgenden wurden daher die Expression und die funktionelle Bedeutung der SK Ionenkanalfamilie in LC Neuronen der Maus untersucht. Des Weiteren sollte ein potenziell neuroprotektiver Einfluss dieser Ionenkanalfamilie anhand verschiedener, für die Parkinson-Erkrankung relevanter, Toxizitätsmodelle aufgedeckt werden.

3.4.1 Expression von SK Kanälen in LC Neuronen

Um aufzuklären, welche Untereinheiten der Ca^{2+} aktivierten Kaliumkanäle in Neuronen des LC funktionell von Bedeutung sein könnten, wurde zunächst mittels RT-PCR ein Expressionsprofil erstellt. Die RT-PCR Analysen zeigten, dass LC Neurone die SK Kanal Untereinheiten SK1, SK2 und SK3 exprimierten. Amplifikate der SK4 (IK) Untereinheit konnten hingegen nicht in LC Neuronen nachgewiesen werden (Abbildung 3.11 A). Als Positivkontrolle wurde die SK4 Untereinheit aus murinem Gehirn amplifiziert (Abbildung 3.11 B). Des Weiteren wurden Amplifikate der BK Kanal Untereinheit in LC Neuronen detektiert (Abbildung 3.11 A).

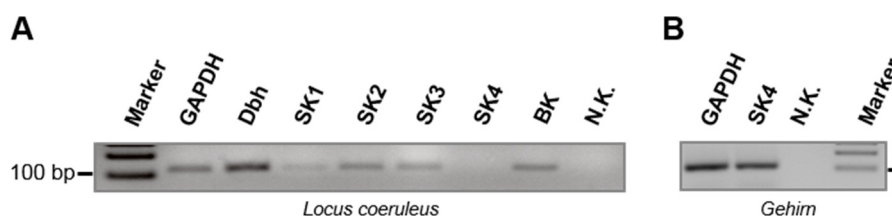


Abbildung 3.11: LC Neurone exprimieren SK und BK Kanal Untereinheiten.

Expressionsanalyse von mRNA aus Hirnschnitten isolierter LC Neurone mittels RT-PCR. Die PCR-Produkte hatten eine Länge von 110-111 Basenpaaren. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und das noradrenerge Markerenzym Dopamin-beta-Hydroxylase (Dbh) dienen als Positivkontrolle. **(A)** Expressionsprofil der SK und BK Kanal Untereinheiten im LC. **(B)** Positivkontrolle für SK4 aus cDNA, die aus murinem Gehirn gewonnen wurde. (N.K.: Negativkontrolle)

3.4.2 Pharmakologie und Funktion der SK Kanäle in LC Neuronen

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass murine LC Neurone eine ausgeprägte Nachhyperpolarisation (NHP) zeigen, welche die erste Phase der „Interspike“ Intervalle dominiert (vergl. 3.1.2 und 3.3.4 sowie (Matschke *et al.*, 2015)). Der Strom, der diese Hyperpolarisation vermittelt, wird im Folgenden als I_{NHP} bezeichnet. In vielen zentralen Neuronen trägt der Kalium Efflux durch Ca^{2+} aktivierte Kaliumkanäle wesentlich zu diesem I_{NHP} bei (Wolfart und Roeper, 2002, Wolfart *et al.*, 2001). Um zu bestimmen, welchen Anteil SK Kanal vermittelte Ströme am I_{NHP} von LC Neuronen im Hirnschnitt-Präparat haben, wurden Messungen in der *Voltage-Clamp* und *Current-Clamp* Konfiguration mit einem SK Kanal Blocker einerseits und mit einem SK Kanal Aktivator andererseits durchgeführt. Als Blockersubstanz diente das Bienengift Apamin, welches SK Kanäle selektiv mit einem IC_{50} von 0,7 bis 8 nM inhibiert (Lamy *et al.*, 2010). Als Kanal-Aktivator wurde die Substanz NS309 verwendet, welche als positiver Modulator von IK und SK Kanälen, nicht aber von BK Kanälen wirkt (Strøbaek *et al.*, 2004).

3.4.2.1 Blockierung SK Kanal-vermittelter Ströme durch Apamin

Zur Isolation der Ströme, die an der NHP von LC Neuronen beteiligt sind, wurden zunächst Messungen in der *Whole-Cell Voltage-Clamp* Konfiguration juveniler LC Neurone im akuten Hirnstammschnitt durchgeführt. In Anlehnung an die in anderen Studien beschriebene erfolgreiche Identifikation von Strömen, die der NHP zentraler Neurone unterliegen, wurde ein hybrides Spannungsprotokoll verwendet (Storm, 1989, Pedarzani und Storm, 1993, Wolfart *et al.*, 2001). Ausgehend von einem Haltepotenzial bei -70 mV wurde das Membranpotenzial für 50 ms auf 0 mV depolarisiert und anschließend auf -50 mV hyperpolarisiert (siehe Einsatz in Abbildung 3.12 A). Dieser hyperpolarisierende Sprung imitiert die Spannungsverhältnisse während der Nachhyperpolarisation eines neuronalen APs. Um zu gewährleisten, dass die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration während der Messungen stabil blieb und nicht unphysiologisch gepuffert wurde, enthielt die Pipettenlösung eine geringe EGTA-Konzentration von 0,1 mM. Der repräsentative NHP Auswärtsstrom von LC Neuronen trat als direkte Folge der Hyperpolarisation auf und erreichte ein Maximum von 502 ± 48 pA (Abbildung 3.12 A). Das Abklingen des Stromes wurde von zwei Komponenten dominiert und konnte mittels einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden (Abbildung 3.12 A-B). Die schnellere Stromkomponente (I_{NHP}) nahm mit einer mittleren Zeitkonstante τ_s von 174 ± 21 ms ab ($n = 9$). Die zweite Stromkomponente zeigte ein deutlich langsames Abklingverhalten mit einer mittleren Zeitkonstante τ_L von 704 ± 77 ms ($n = 9$) (Abbildung 3.12 B).

Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen früherer Studien überein, die die NHP Ströme dopaminerger SNpc Neurone oder cholinerg DMV Neurone untersuchten (Sah, 1996, Wolfart *et al.*, 2001). Daher sollte im Folgenden mittels des SK Kanal Blockers Apamin überprüft werden, welchen Anteil der SK Kanal vermittelte Kalium Efflux am I_{NHP} von LC Neuronen hat. Abbildung 3.12 C illustriert repräsentative NHP Ströme vor und nach Applikation von 200 nM Apamin. Es wird deutlich, dass die Inhibition von SK Kanälen primär zu einer Reduktion des maximalen Stromes führte, während die persistierende Stromkomponente kaum beeinflusst wurde (Abbildung 3.12 C, dunkelgrau). Die Analyse des auf die jeweilige Zellgröße normalisierten maximalen Stromes ergab, dass Apamin die Stromdichte signifikant von $9,8 \pm 1,2$ pA/pF auf $5,6 \pm 0,9$ pA/pF reduzierte ($n = 6$) (Abbildung 3.12 D). Die schmale Amplitude des Apamin-sensitiven Differenzstromes mit steilem Abklingen deutete zusätzlich daraufhin, dass SK Kanäle vor allem zur schnellen Komponente des I_{NHP} von LC Neuronen beitragen (Abbildung 3.12 C, hellgrau). Um diese Hypothese zu verifizieren wurde der jeweilige Anteil der schnellen und langsamen Stromkomponente an der I_{NHP} Amplitude von Kontrollmessungen und Messungen nach Apamin-Applikation verglichen. Die Inhibition von SK Kanälen verringerte den Anteil der sI_{NHP} signifikant von $22,2 \pm 2\%$ in Kontrollmessungen ($n = 9$) auf $9,7 \pm 1,6\%$ ($n = 6$) (Abbildung 3.12 E). Der Anteil der langsamen Komponente blieb unverändert (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass SK Kanäle einen signifikanten Anteil zu den Strömen, die während der NHP von LC Neuronen fließen, beitragen.

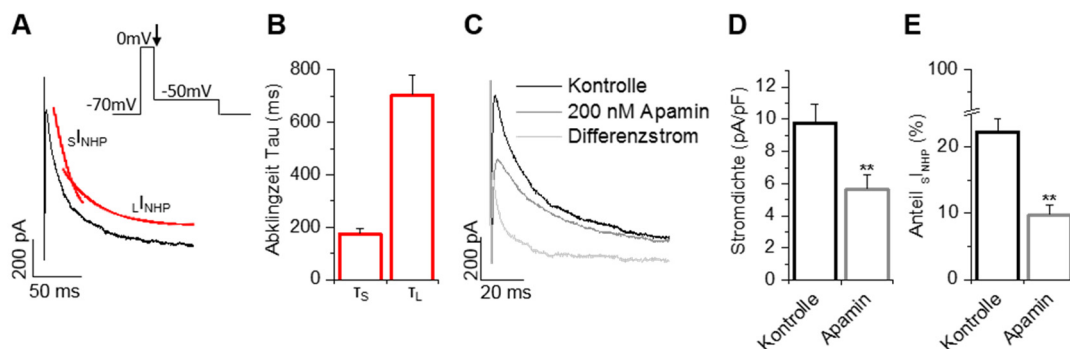


Abbildung 3.12: Pharmakologische Isolation SK Kanal vermittelter Komponenten des I_{NHP} coeruleärer Neurone.

Whole-Cell Voltage-Clamp Messungen mit 0,1 mM EGTA in der Pipettenlösung. **(A)** Repräsentative Stromantwort auf einen Spannungssprung zu -50 mV eines Hybrid-Spannungsprotokolls (siehe Einsatz). Das Abklingverhalten des Stromes konnte durch eine biexponentielle Funktion mit einer schnellen (sI_{NHP}) und einer langsamen (lI_{NHP}) Komponente beschrieben werden (rote Linien). **(B)** Quantifizierung der Zeitkonstanten der Stromabnahme. Die Zeitkonstanten τ_s (T_s für schnell) und τ_L (T_L für langsam) wurden mathematisch bestimmt. Die schnelle Komponente nahm mit einer Zeitkonstante τ_s von 172 ± 20 ms ab, der Wert für τ_L betrug 704 ± 77 ms ($n = 9$). **(C)** Beispielströme vor (schwarze Linie) und nach Applikation von 200 nM Apamin (dunkelgraue Linie). Der Differenzstrom (hellgraue Linie) illustriert, dass Apamin primär den maximalen Strom und die schnell abklingende Stromkomponente reduzierte. **(D)** Quantifizierung des auf die jeweilige Zellgröße normalisierten maximalen Stromes am Beginn des Spannungssprungs zu -50 mV (vgl. Spannungsprotokoll in A) vor und nach Apamin Applikation. Apamin reduzierte die maximale Stromdichte von $9,8 \pm 1,2$ pA/pF auf $5,6 \pm 0,9$ pA/pF ($n = 6$). **(E)** Anteil der schnellen Stromkomponente sI_{NHP} vor und nach Blockade der SK Kanäle mit Apamin. Apamin führte zu einer signifikanten Reduktion der schnellen Stromkomponente von $22,2 \pm 2\%$ in Kontrollmessungen ($n = 9$) auf $9,7 \pm 1,6\%$ ($n = 6$). **, bedeutet $P \leq 0,01$ kalkuliert mittels des gepaarten Student's T-Tests.

Um einen möglichen physiologischen Einfluss der identifizierten SK Kanal vermittelten Ströme auf den intrinsischen Schrittmachermechanismus juveniler LC Neurone zu untersuchen wurden zunächst *Current-Clamp* Messungen in der *Whole-Cell* Konfiguration durchgeführt. Die schnelle synaptische Transmission wurde mittels Glutamaterger und GABAerger Blocker inhibiert um den intrinsischen Schrittmachermechanismus isoliert betrachten zu können. Nach der Aufnahme von AP-Folgen, die über einen Zeitraum von zwei Minuten eine stabile Frequenz aufwiesen, wurde die extrazelluläre ACSF gegen ACSF mit 200 nM Apamin ausgetauscht. In diesem Versuchsaufbau war keine Apamin-bedingte signifikante Veränderung der Feuerrate detektierbar ($n = 4$) (nicht gezeigt). Während mehrminütiger Messungen in der *Whole-Cell* Konfiguration wird das intrazelluläre Milieu des Neurons nahezu vollständig gegen die Pipettenlösung ausgetauscht. Eine dadurch entstehende Verschiebung des physiologischen Calcium Gleichgewichts könnte zu einer verringerten Aktivität von SK Kanälen führen, so dass eine Inhibition mittels Apamin nicht mehr ausreichend detektierbar ist. Im Folgenden wurden daher Experimente in der *Gramicidin-Perforated-Patch* Konfiguration durchgeführt, welche ein intaktes intrazelluläres Milieu gewährleistet. Die LC Neurone zeigten in dieser Konfiguration typische spontane APs mit einer durchschnittlichen Frequenz von $3,5 \pm 0,7$ Hz (Abbildung 3.13 A, links). Erstaunlicherweise führte der Lösungswechsel zu mit 200 nM Apamin komplementierter ACSF zwei Minuten nach Messbeginn nun zu einer deutlichen Beschleunigung der intrinsischen Schrittmacherfrequenz (Abbildung 3.13 A). Die Quantifizierung der relativen Feuerrate ergab, dass die Inhibition von SK Kanälen durch Apamin eine signifikante, 1,4 fache, Beschleunigung der AP-Frequenz im Vergleich zu Kontrollmessungen bedingte ($n = 7$) (Abbildung 3.13 B). Um zu untersuchen, ob SK Kanäle neben der Frequenz auch die Regelmäßigkeit des intrinsischen Schrittmachers von LC Neuronen regulieren, wurden die Abstände zwischen den einzelnen APs, die „Interspike“ Intervalle (ISI), analysiert. Abbildung 3.13 C illustriert repräsentativ die ISIs einer Kontrollmessung (oben) und einer Messung nach Apamin-Applikation (unten). Die Verteilung der ISIs konnte jeweils mit einer einfachen Gauss-Kurve beschrieben werden (Abbildung 3.13 C). In Konsistenz zu der Frequenzanalyse waren die durchschnittlichen ISIs nach Inhibition der SK Kanäle durch Apamin zu kleineren Werten verschoben (Kontrolle: $1,3 \pm 0,07$ ms, $n = 6$; Apamin: $0,8 \pm 0,01$ ms, $n = 6$) (Abbildung 3.13 C). Als Maß für die Regelmäßigkeit, mit der die APs auftreten, also für die Präzision des Schrittmachermechanismus, wurde der Variationskoeffizient (CV) aus dem Quotienten der Standardabweichung der Gauss-Kurve und dem durchschnittlichen ISI berechnet (Wolfart *et al.*, 2001). Der Schrittmachermechanismus von LC Neuronen unter Kontrollbedingungen zeigte mit einem CV von 21 ± 8 % einen hohen Grad an Präzision ($n = 8$) (Abbildung 3.13 D). Nach Apamin Applikation betrug der durchschnittliche CV 19 ± 6 % ($n = 7$) (Abbildung 3.13 D). Die Regelmäßigkeit der APs wurde demnach durch Inhibition der SK Kanäle nicht signifikant beeinflusst.

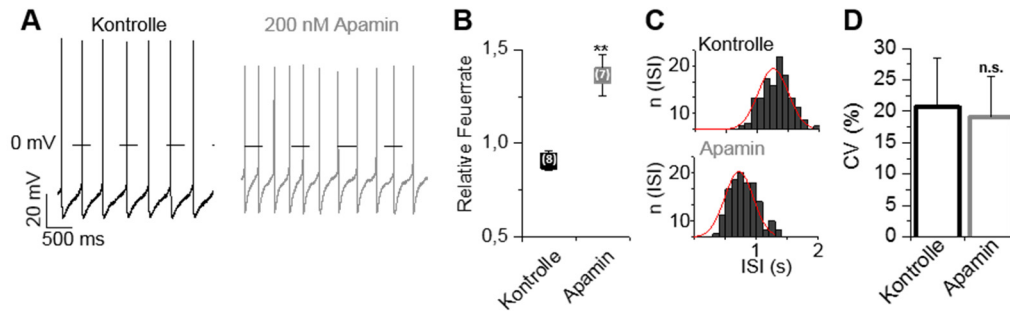


Abbildung 3.13: SK Kanäle regulieren die Schrittmacher-Frequenz spontanaktiver LC Neurone.

(A) Repräsentative Aktionspotenzial-Abfolgen vor (links) und nach Apamin-Applikation (rechts), die in der *Perforated-Patch Current-Clamp* Konfiguration aufgenommen wurden. (B) Quantifizierung der relativen Feuerrate. Die AP-Frequenz 2 min nach Wechsel zu Apamin- oder Kontrolllösung wurde für jede Messung in Relation zu der Frequenz vor dem Lösungswechsel gesetzt. (C) „Interspike“ Interval (ISI) Histogramme von Kontrollmessungen (oben) und nach Zugabe von 200 nM Apamin zur Badlösung (unten). Die ISI Frequenzverteilungen konnten durch einfache Gauss-Kurven beschrieben werden (rote Linien). (D) Analyse des ISI Variationskoeffizienten („coefficient of variation“, CV) aus den in (C) ermittelten Daten. Die Inhibition von SK Kanälen mittels Apamin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Schrittmacher-Präzision (Kontrolle, CV = $21 \pm 8\%$; Apamin, CV = $19 \pm 6\%$). (A-D: Kontrolle, n = 8; Apamin, n = 7). n.s.: Nicht signifikant, **, bedeutet $P \leq 0,01$ kalkuliert mittels des ungepaarten Student's T-Tests.

Im vorherigen Abschnitt wurde in *Voltage-Clamp* Messungen dargestellt, dass ein signifikanter Anteil der während der Nachhyperpolarisation von LC Neuronen fließenden Ströme von SK Kanälen vermittelt wird. Daher ergab sich die Hypothese, dass die Beschleunigung der Schrittmacherfrequenz durch Apamin am wahrscheinlichsten auf eine Verkleinerung der Nachhyperpolarisation zurückzuführen ist. Diese Verkleinerung würde dazu führen, dass das Schwellenpotenzial für ein nächstes AP schneller erreicht und die Feuerrate so erhöht wird. Des Weiteren könnte die Inhibition von SK Kanälen aber auch zu einer generellen Verschiebung des Membranpotenzials coeruleärer Neurone führen und so eine Frequenz-Erhöhung auslösen. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurden die unterschiedlichen AP-Parameter näher analysiert (Abbildung 3.14). Schon die Überlagerung einer repräsentativen AP-Sequenz vor und nach Apamin-Applikation zeigte eine deutliche Verkleinerung der NHP und eine verringerte AP-Höhe, während das durchschnittliche Membranpotenzial und das Schwellenpotenzial unverändert blieben (Abbildung 3.14 A). Die Quantifizierung der relativen Werte bestätigte diese Beobachtung. Während das relative Membranpotenzial nicht signifikant durch die Apamin-Applikation beeinflusst wurde (Abbildung 3.14 B), kam es zu einer signifikanten Verkleinerung der relativen NHP Amplitude (Abbildung 3.14 C) (Kontrolle: n = 8, Apamin: n = 7). Die absolute NHP Amplitude war nach Inhibition der SK Kanäle im Vergleich zu Kontrollmessungen um $5,4 \pm 1,2$ mV reduziert (n = 7) (Abbildung 3.14 D). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass SK Kanäle über die direkte Modulation der Nachhyperpolarisation maßgeblich an der Frequenz-Regulation des intrinsischen Schrittmachermechanismus von LC Neuronen beteiligt sind.

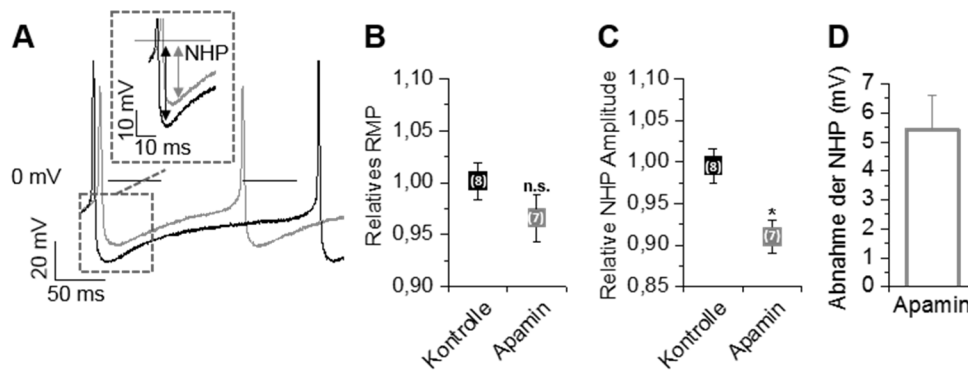


Abbildung 3.14: Apamin erhöht die Schrittmacher-Frequenz über die Modulation der Nachhyperpolarisation.

(A) Repräsentative *Current-Clamp* Aufnahmen in der *Perforated-Patch* Konfiguration vor (schwarze Linie) und nach Applikation von 200 nM Apamin (graue Linie). Der Einsatz illustriert die durch Apamin induzierte Verkleinerung der Nachhyperpolarisation (NHP) (Pfeile). (B) Relative Apamin-induzierte Veränderungen des mittleren Membranpotenzials (RMP). Das RMP wurde als mittleres Potenzial definiert um welches die Spannung im Verlauf der Aktionspotenzialabfolge fluktuierte. (C) Relative Veränderung der NHP Amplitude. Die Apamin Applikation resultierte in einer signifikanten Verkleinerung der NHP Amplitude. (D) Absolute Abnahme der NHP Amplitude. Im Vergleich zu Kontrollmessungen war die mittlere NHP Amplitude nach Apamin Applikation um $5,4 \pm 1,2$ mV kleiner. (A-D: Kontrolle, n = 8; Apamin, n = 7). n.s.: Nicht signifikant, *, bedeutet $P \leq 0,05$ kalkuliert mittels des ungepaarten Student's T-Tests.

3.4.2.2 Aktivierung SK Kanal-vermittelter Ströme durch NS309

Um die physiologische Bedeutung der SK Kanäle in LC Neuronen weitergehend zu studieren sollte neben der Inhibition auch der Effekt einer Aktivierung dieser Kanäle untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden geringe (1 μ M) und hohe (20 μ M) Konzentrationen des positiven SK Kanal Modulators NS309 verwendet. NS309 verschiebt die Ca^{2+} Sensitivität von SK Kanälen und IK Kanälen zu geringeren Werten und führt so zu einer erhöhten Leitfähigkeit (Strøbaek *et al.*, 2004). In Abschnitt 3.4.1 wurde gezeigt, dass die drei SK Kanal Untereinheiten SK1, SK2 und SK3, nicht aber die IK Kanal Untereinheit SK4 in LC Neuronen exprimiert sind (Abbildung 3.11). Daher kann angenommen werden, dass ein NS309 vermittelter Effekt in LC Neuronen primär durch Aktivierung von SK Kanälen zustande kommt. Um zu untersuchen, ob eine vermehrte Aktivierung von SK Kanälen einen Einfluss auf den intrinsischen Schrittmachermechanismus von LC Neuronen hat, wurden wie im vorherigen Abschnitt, *Current-Clamp* Messungen in der *Perforated-Patch* Konfiguration durchgeführt (Abbildung 3.15). Wenn über einen Zeitraum von zwei Minuten APs mit einer konstanten Frequenz aufgenommen wurden, wurde die Kontroll-ACSF gegen ACSF, die mit der jeweiligen NS309 Konzentration versetzt war, ausgetauscht. Als Kontrolle dienten Messungen, die einen Lösungswechsel zu einer zweiten Kontroll-ACSF einschlossen. In Abbildung 3.15 A und B sind repräsentative AP-Folgen vor und zwei Minuten nach Applikation von 1 μ M (A) oder 20 μ M (B) NS309 dargestellt.

Die NS309 Applikation resultierte konzentrationsabhängig in einer Verlangsamung der Feuerrate. Während die AP-Frequenz durch 1 μM NS309 von $2,6 \pm 0,6$ Hz in Kontrollmessungen ($n = 7$) auf $1,7 \pm 0,5$ Hz ($n = 5$) gesenkt wurde, betrug die durchschnittliche Feuerrate nach Applikation von 20 μM NS309 nur noch $0,4 \pm 0,2$ Hz ($n = 6$) (Abbildung 3.15 A-B). Innerhalb von zwei Minuten nach der Applikation von 20 μM NS309 stellten 2 von 6 gemessenen LC Neuronen die Spontanaktivität vollständig ein. In Übereinstimmung dazu ergab die Quantifizierung der relativen Feuerrate zwei Minuten nach Substanz-Applikation eine signifikante Frequenzverlangsamung durch 1 μM NS309 ($n = 5$) und eine hochsignifikante Verlangsamung durch 20 μM NS309 im Vergleich zu Kontrollmessungen (Abbildung 3.15 C).

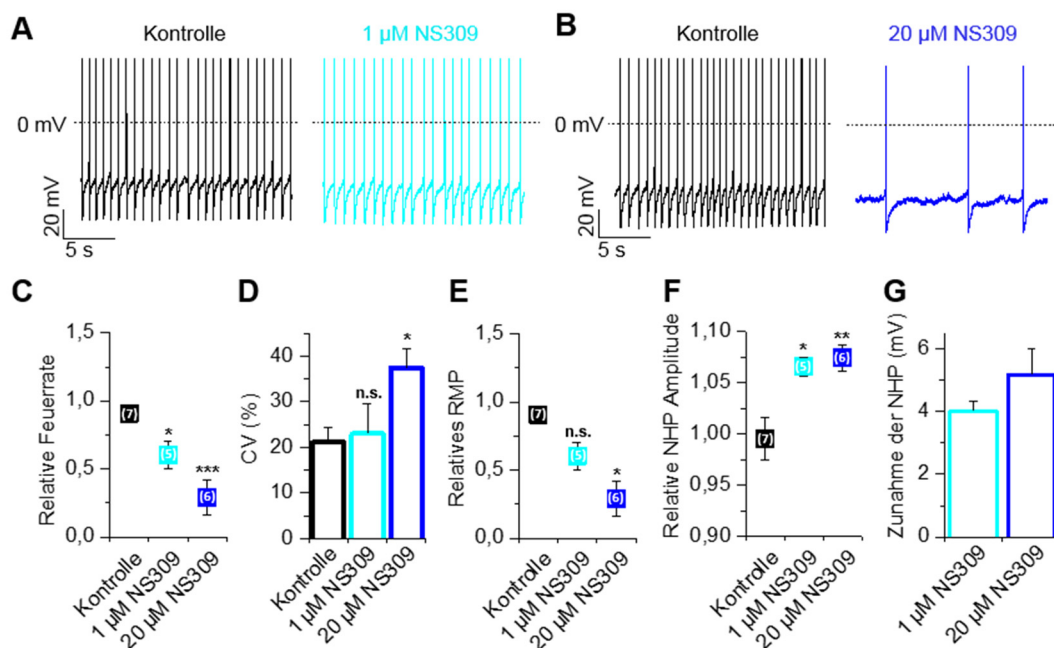


Abbildung 3.15: Die Aktivierung von SK Kanälen durch NS309 verlangsamt konzentrationsabhängig die Frequenz spontanaktiver LC Neurone.

Die APs juveniler LC Neurone wurden im *Current-Clamp* in der *Perforated-Patch* Konfiguration aufgenommen. (A-B) Beispielhafte Aktionspotenzial-Abfolgen vor (schwarz) und nach Applikation von 1 μM (hellblau) oder 20 μM NS309 (blau). (C) Quantifizierung der relativen Feuerrate. Die AP-Frequenz 2 min nach Lösungswechsel zu NS309- oder Kontroll-ACSF wurde jeweils relativ zu der Frequenz vor dem Lösungswechsel gesetzt. (D) Analyse des „Interspike“ Intervall Variationskoeffizienten (CV). Kontrolle, CV = $21 \pm 3,3$ %; 1 μM NS309, CV = $23 \pm 6,5$ %; 20 μM NS309, CV = $37 \pm 4,3$ %. Für die Berechnung siehe Beschreibung in Abbildung 3.13 D. (E) Relative Veränderung des Membranpotenzials (RMP) von Kontrollmessungen und nach Applikation von 1 μM oder 20 μM NS309. Das RMP wurde als mittleres Potenzial definiert um welches die Spannung im Verlauf der Aktionspotenzialabfolge fluktuierte. (F) Quantifizierung der relativen Nachhyperpolarisation (NHP). Sowohl 1 μM als auch 20 μM NS309 vergrößerten die NHP Amplitude signifikant. (G) Absolute Zunahme der NHP Amplitude nach NS309-Applikation. 1 μM NS309 vergrößerte die NHP um $4,0 \pm 0,3$ mV, 20 μM NS309 führten zu einer Vergrößerung von $5,2 \pm 0,8$ mV. (A-G: Kontrolle, $n = 7$; 1 μM NS309, $n = 5$; 20 μM NS309, $n = 6$). n.s.: Nicht signifikant, *: $P \leq 0,05$, **: $P \leq 0,01$, ***: $P \leq 0,001$, kalkuliert mittels des ungepaarten Student's T-Tests.

In Abschnitt 3.4.2.1 wurde gezeigt, dass die Inhibition von SK Kanälen durch Apamin keinen Einfluss auf die Regelmäßigkeit der intrinsisch generierten APs von LC Neuronen hat. Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von SK Kanälen hingegen die Präzision des Schrittmachers verändert, wurden wiederum Histogramme der ISI Verteilung erstellt und daraus der Variationskoeffizient der Kontrollmessungen und der Messungen nach NS309 Applikation errechnet. Unter Kontrollbedingungen traten die APs in Konsistenz zu den in Abschnitt 3.4.2.1 ermittelten Daten in sehr regelmäßigen Abständen mit einem CV von $21 \pm 3,3 \%$ auf ($n = 7$) (Abbildung 3.15 D). Mit steigender NS309 Konzentration wurden die APs zunächst tendenziell ($1 \mu\text{M}$ NS309, CV = $23 \pm 6,5 \%$, $n = 5$), dann signifikant ($20 \mu\text{M}$ NS309, CV = $37 \pm 4,3 \%$, $n = 7$) unregelmäßiger (Abbildung 3.15 D). Die Präzision des Schrittmachers wurde demnach durch die verstärkte Aktivierung von SK Kanälen herabgesetzt.

Der frequenzsteigernde Effekt einer SK Kanal Inhibition durch Apamin war maßgeblich auf die reduzierte NHP Amplitude und nicht auf eine generelle Verschiebung des Membranpotenzials zu positiveren Werten zurückzuführen (vergleiche 3.4.2.1). Ob die NS309 bedingte Frequenzverlangsamung durch den gegensätzlichen Mechanismus hervorgerufen wurde, sollte mittels der weitergehenden Analyse dieser Parameter aufgeklärt werden. Erstaunlicherweise ergab die Quantifizierung des relativen Membranpotenzials, dass es als Folge einer massiven SK Kanal Aktivierung durch $20 \mu\text{M}$ NS309 zu einer signifikanten Hyperpolarisation der Membran im Vergleich zu Kontrollmessungen kam. Die partielle Aktivierung mit $1 \mu\text{M}$ NS309 zeigte dieselbe Tendenz, blieb jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus (Abbildung 3.15 E). Des Weiteren resultierte die Applikation beider Konzentrationen aber auch in einer deutlichen Veränderung der NHP Amplitude. Die relative NHP Amplitude nahm sowohl als Folge der Applikation von $1 \mu\text{M}$ als auch von $20 \mu\text{M}$ NS309 im Vergleich zu Kontrollmessungen signifikant zu (Abbildung 3.15 F). Die absolute Amplituden Vergrößerung betrug nach $1 \mu\text{M}$ NS309 $4,0 \pm 0,3 \text{ mV}$ und nach $20 \mu\text{M}$ NS309 $5,2 \pm 0,8 \text{ mV}$ (Abbildung 3.15 G).

In den vorherigen Versuchen fiel auf, dass 33% der gemessenen LC Neurone bereits zwei Minuten nach Applikation einer hohen NS309 Konzentration aufhörten spontane APs zu generieren. Dieser Effekt war nicht auswaschbar ($n = 5$) (nicht gezeigt). Des Weiteren fiel auf, dass die Applikation von $20 \mu\text{M}$ NS309 im Gegensatz zur in Absatz 3.4.2.1 beschriebenen Apamin-Applikation neben einer veränderten NHP Amplitude auch eine Veränderung des Membranpotenzials hervorrief. Diese Diskrepanz könnte darauf hindeuten, dass die durch die hohe NS309 Konzentration bedingten Effekte nicht allein auf eine SK Kanal Aktivierung zurückzuführen sind.

Mittels AP Messungen über einen langen Zeitraum von 20 Minuten sollte daher im Folgenden beleuchtet werden, ob i) die Spontanaktivität der LC Neurone generell nach einer lang andauernden NS309 Exposition vollständig zum Erliegen kommt und ii) dieser Effekt SK Kanal vermittelt und damit durch Apamin Applikation antagonisierbar ist (Abbildung 3.16). Die repräsentative Messung in Abbildung 3.16 A illustriert, dass 60 % der untersuchten Neurone innerhalb eines Zeitraumes von 9 Minuten nach Applikation von 20 μ M NS309 keine intrinsischen APs mehr generierten. Die anschließende Superfusion mit Apamin komplementierter ACSF führte jedoch nach 2 Min zum Wiederauftreten von APs und nach weiteren 3 Minuten zu einer Feuerrate vergleichbar zur anfänglichen AP-Frequenz. In den restlichen 40 % der Messungen kam es nach NS309 Applikation zu einer deutlichen Frequenzverlangsamung. Auch dieser Effekt wurde durch anschließende Apamin Applikation aufgehoben. Die Quantifizierung der zeitabhängigen Frequenzveränderung aller gemessenen Neurone bestätigte diese Beobachtung ($n = 5$) (Abbildung 3.16 B). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Auswirkung der hohen NS309 Konzentration auf die Spontanaktivität coeruleärer Neurone primär in der Rekrutierung aktivierbarer SK Kanäle begründet ist. Diese Daten unterstützen erneut die Hypothese, dass SK Kanäle eine wichtige Rolle in der Regulation des intrinsischen Schrittmachermechanismus von LC Neuronen spielen.

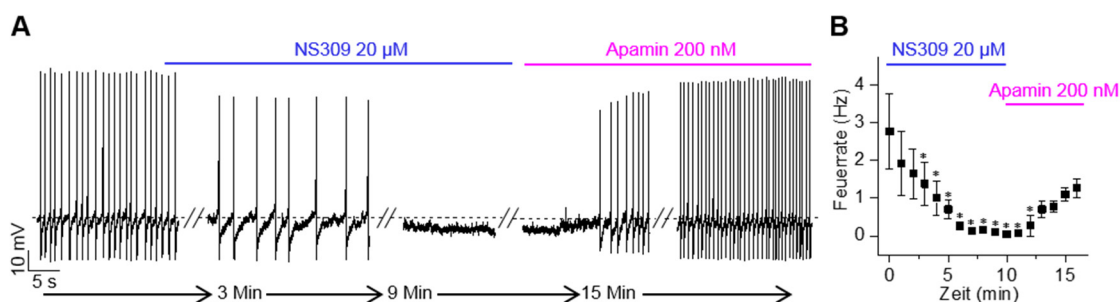


Abbildung 3.16: Die SK Kanal Aktivierung mit NS309 ist zeitabhängig und wird durch Apamin antagonisiert.

(A) Repräsentative *Current-Clamp* Messungen in der *Perforated-Patch* Konfiguration eines juvenilen LC Neurons über einen Zeitraum von 20 min. Nach dem Auftreten regelmäßiger Aktionspotenziale für 5 Minuten, wurden zunächst 20 μ M NS309 und anschließend 200 nM Apamin appliziert. (B) Darstellung der mittleren zeitabhängigen Veränderung der Feuerrate nach SK Kanal Aktivierung durch NS309 und Antagonisierung durch Apamin ($n = 5$). *: $P \leq 0,05$, kalkuliert mittels des gepaarten Student's T-Tests.

3.4.3 Neuroprotektives Potential der SK Kanal-Aktivierung

Aktivitätsabhängiger oxidativer Zellstress wird in neueren Studien als gemeinsames Merkmal dopaminerger SNpc, cholinerges DMV und noradrenerger LC Neurone während der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung beschrieben (Surmeier *et al.*, 2011, Sanchez-Padilla *et al.*, 2014). Während bereits zahlreiche Studien durchgeführt wurden, die die physiologischen Veränderungen dopaminerger SNpc Neuronen in verschiedenen *in vitro* oder *in vivo* Parkinson Modellen beschreiben, wurden die Auswirkungen auf Neurone des LC bisher unzureichend behandelt. Um die Sensitivität der noradrenergen LC Neurone auf metabolischen Stress zu untersuchen, wurde daher im Folgenden zum einen die Wirkung von Glutamat und zum anderen von Rotenon getestet. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob der zuvor beschriebene aktivitätsregulierende Effekt der SK Kanal Aktivierung einen protektiven Effekt im Rahmen dieser toxischen Bedingungen haben könnte.

3.4.3.1 Antagonisierung der Glutamat bedingten Ca^{2+} -Überladung isolierter LC Neurone

Es ist bekannt, dass eine chronisch erhöhte Konzentration an freiem intrazellulären Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ein zentrales Element verschiedener neuronaler Signalwege ist, die zum Zelltod führen (Surmeier *et al.*, 2011). Ein gängiges Modell der zytotoxischen Ca^{2+} Überladung neuronaler Zellen ist die Applikation hoher Konzentrationen des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat (Beal, 1998). Zunächst sollte daher überprüft werden, ob eine Modulation von SK Kanälen die Ca^{2+} Homöostase coeruleärer Neurone unter Glutamat-Exposition beeinflussen kann. Hierzu wurden primäre LC Neuronenkulturen angelegt und Calcium Imaging Experimente mittels des Calcium Markers FURA-2 AM durchgeführt. Abbildung 3.17 A illustriert beispielhaft zwei dissoziierte LC Neurone sieben Tage nach Beginn der Kultivierung. Zur Verifizierung ihrer noradrenergen Identität wurden die Neurone mit einem Anti-TH Antikörper gefärbt (Abbildung 3.17 A). Zur Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde jeweils ein Neuron pro Blickfeld mit Exzitationswellenlängen von 340 nm und 380 nm angeregt und die Fluoreszenzintensitäten aufgezeichnet. Das Verhältnis dieser Intensitäten (F Verhältnis) diente als direktes Maß der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Die Anregung bei 360 nm diente zur Darstellung des gesamten Neurons. Visuell konnte eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} Levels anhand einer Farbskala als Verfärbung von blau nach rot verfolgt werden (Abbildung 3.17 B). Als direkte Antwort auf die Applikation von 20 μM Glutamat war in Kontrollmessungen ein deutlicher Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu verzeichnen (Abbildung 3.17 B oben und C). Eine 30-minütige Vorinkubation der LC Neurone mit 20 μM NS309 beeinflusste nicht das basale Ca^{2+} -Level, aber verhinderte den massiven Glutamat-bedingten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abbildung 3.17 B mitte und C). Im Gegensatz dazu war bei Vorinkubation der Neurone mit 1 μM Apamin als Antwort auf die Glutamat-Exposition ein im Vergleich zu den

Kontrollmessungen noch ausgeprägter Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} Levels detektierbar (Abbildung 3.17 B unten und C). Die Quantifizierung des F Verhältnisses fünf Minuten nach Glutamat-Applikation bestätigte diese Beobachtungen und zeigte eine signifikante Reduktion des Glutamat bedingten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstiegs bei vorheriger Aktivierung von SK Kanälen mit 20 μM NS309. Die Inhibition von SK Kanälen durch Apamin hingegen führte zu einem signifikant stärkeren Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} Levels im Vergleich zu Kontrollmessungen (n = jeweils 14 Zellen) (Abbildung 3.17 D).

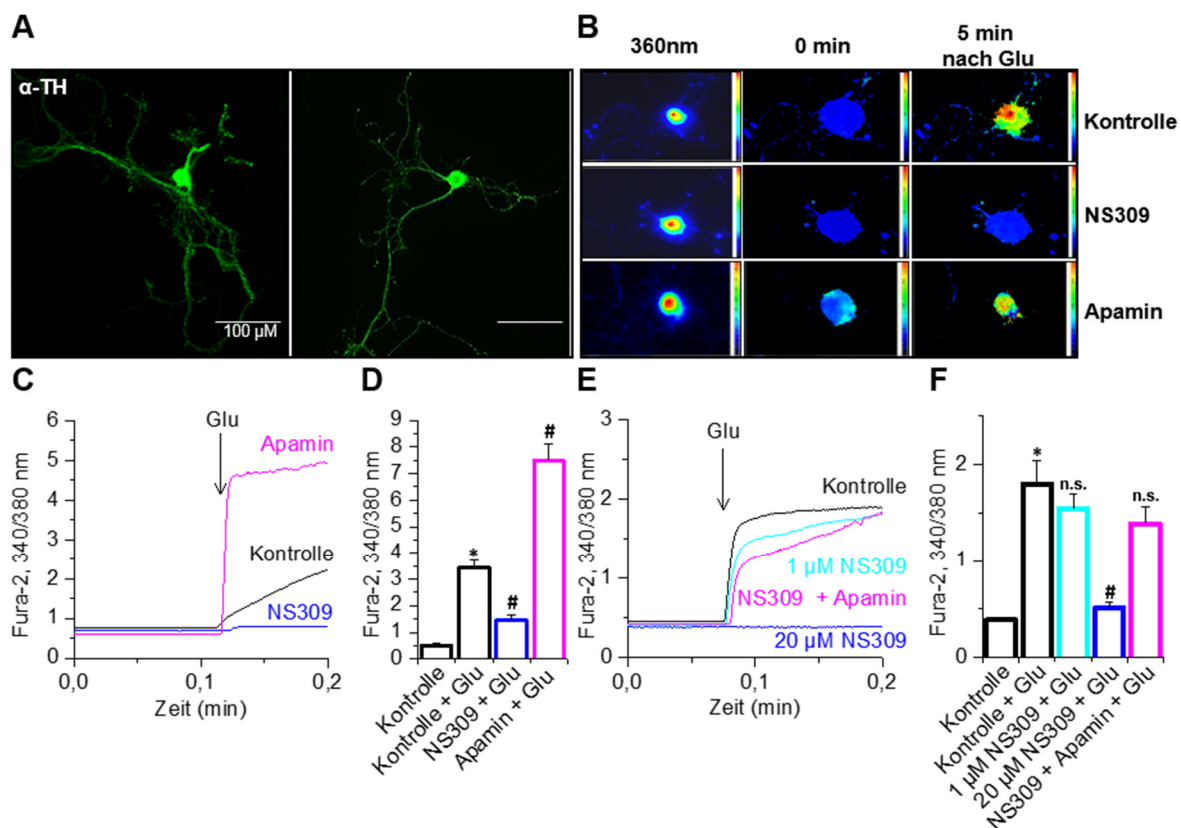


Abbildung 3.17: NS309 verhindert konzentrationsabhängig den Glutamat induzierten Ca^{2+} Influx primärer, isolierter LC Neurone.

(A) Illustration von zwei primären LC Neuronen, die mit einem Anti-TH-Erstantikörper und einem Alexa488 gekoppelten Zweitantikörper (grün) markiert wurden. (B) Repräsentatives Calcium Imaging mittels FURA-2 AM bei Exzitationswellenlängen von 360 nm (links) und 340 nm (mitte und rechts) von unbehandelten Zellen (oben) und Zellen, die mit 20 μM NS309 oder 1 μM Apamin vorinkubiert wurden (mitte und unten). Die Fluoreszenzintensität kann anhand der Farbskala abgelesen werden (blau bedeutet geringe Intensität und geringe $[\text{Ca}^{2+}]_i$, rot bedeutet hohe Intensität und hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$). Bei Vorinkubation mit NS309 war nach fünfminütiger Glutamat (Glu) Exposition keine Steigerung der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. (C) Repräsentativer Zeitverlauf des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten (F Verhältniss) bei Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm während der Applikation von 20 μM Glutamat unter Kontrollbedingungen (schwarz) und nach Vorinkubation mit 20 μM NS309 (blau) oder 1 μM Apamin (magenta). (D) Quantifizierung des F Verhältnisses nach 5 Min ohne Glutamat-Applikation (Kontrolle), mit Glutamat-Applikation und mit Glutamat-Applikation nach Vorinkubation mit 20 μM NS309 oder 1 μM Apamin (n = jeweils 14 Zellen). (E) Repräsentativer Zeitverlauf des F Verhältnisses während der Glutamat-Applikation nach Vorinkubation mit 1 μM oder 20 μM NS309 oder simultaner Vorinkubation mit 20 μM NS309 und 1 μM Apamin. (F) Quantifizierung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wie in D). Die Vorinkubation mit 1 μM NS309 sowie die simultane Inkubation mit 1 μM Apamin und 20 μM NS309 bewirkten keine Reduktion des Glutamat-induzierten Ca^{2+} Influx (n = jeweils 18 Zellen). *: $P \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle; #: $P \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle + Glutamat; n.s.: Nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle + Glutamat, kalkuliert mittels des Mann-Whitney U Tests.

In Abschnitt 3.4.2.2 wurde gezeigt, dass schon eine geringe NS309 Konzentration von 1 μM ausreichte um die Feuerrate von LC Neuronen zu verlangsamen. Im Folgenden sollte daher überprüft werden, ob die Glutamat-bedingte Ca^{2+} Überladung coeruleärer Neurone auch mit dieser geringen NS309 Konzentration reduziert werden kann. Der Zeitverlauf sowie die Quantifizierung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach fünfminütiger Glutamat-Exposition bestätigten die Reduktion durch Vorinkubation mit 20 μM NS309, nach Vorinkubation mit 1 μM NS309 konnte hingegen kein Unterschied zu Kontrollmessungen festgestellt werden ($n =$ jeweils 18 Zellen) (Abbildung 3.17 E-F). Um zu überprüfen, ob NS309 in der hohen Konzentration von 20 μM tatsächlich über die Aktivierung membranständiger SK Kanäle den Glutamat-Effekt antagonisierte, wurden LC Neurone in einem weiteren Ansatz simultan mit 20 μM NS309 und 1 μM Apamin vorinkubiert. Nach Glutamat-Exposition war hier keine Reduktion des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstiegs im Vergleich zu Kontrollzellen zu verzeichnen ($n = 18$) (Abbildung 3.17 E-F). Diese Daten lassen die Hypothese zu, dass eine Aktivierung membranständiger SK Kanäle die Ca^{2+} Homöostase coeruleärer Neurone im Rahmen stressvoller Stimuli, wie der Applikation zytotoxischer Glutamat-Konzentrationen, normalisieren kann.

3.4.3.2 Antagonisierung der Rotenon bedingten Ca^{2+} - Überladung isolierter LC Neurone

Das Neurotoxin Rotenon inhibiert den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und dient als experimentelles Modell zur Auslösung von Symptomen, die denen der Parkinson-Erkrankung ähneln (Mounsey und Teismann, 2010). In früheren Studien an dopaminergen Mittelhirn Neuronen konnte demonstriert werden, dass der neurotoxische Effekt des Rotenons unter anderem auf eine dysregulierte Ca^{2+} Homöostase und daraus resultierenden oxidativen Stress zurückzuführen ist (Freestone *et al.*, 2009). Welche Wirkung eine Rotenon Exposition *in vitro* auf Neurone des LC hat, wurde hingegen bisher nicht untersucht. Im Folgenden sollte daher anhand primärer LC Neuronenkulturen untersucht werden, ob die akute Rotenon Exposition das intrazelluläre Ca^{2+} Level coeruleärer Neurone verändert. Aufgrund der zuvor erhobenen Daten im Glutamat-Exzitotoxizitätsmodell sollte des Weiteren aufgeklärt werden, ob die Aktivierung von SK Kanälen auch hier einer Dysregulation der Ca^{2+} Homöostase entgegenwirken kann. Abbildung 3.18 A illustriert repräsentative Momentaufnahmen von LC Neuronen während Calcium Imaging Experimenten unter Kontrollbedingungen (oben) oder nach Vorinkubation mit 20 μM NS309 oder 20 μM NS309 und 1 μM Apamin (unten). Direkt nach Applikation von 1 μM Rotenon war unter Kontrollbedingungen ein deutlicher Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ detektierbar. Neurone, die zuvor für 30 Minuten mit NS309 inkubiert wurden, zeigten nach Rotenon Exposition hingegen nur einen minimalen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abbildung 3.18 A und Zeitverlauf des F Verhältnisses in B).

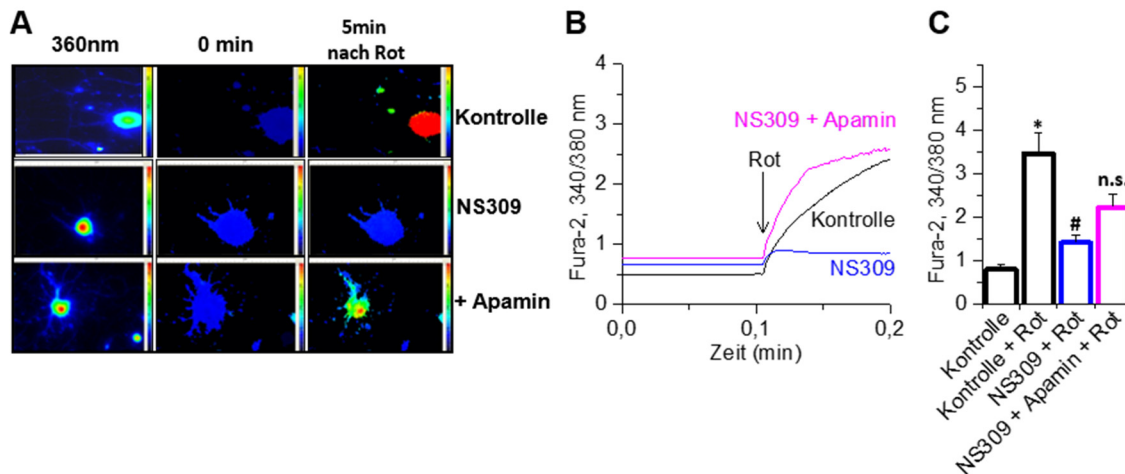


Abbildung 3.18: NS309 antagonisiert die Rotenon induzierte Ca²⁺ Überladung primärer LC Neurone.

(A) Repräsentatives Calcium Imaging von Kontroll-Zellen (oben) und Zellen nach Vorinkubation mit 20 μM NS309 oder 20 μM NS309 + 1 μM Apamin (unten). Fünf Minuten nach Applikation von 1 μM Rotenon (Rot) war unter Kontrollbedingungen und unter NS309 + Apamin ein deutlicher Anstieg der [Ca²⁺]_i (indiziert durch die Farbveränderung von blau nach rot) detektierbar. NS309 behandelte Zellen zeigten nach Rotenon-Applikation keine Änderung der Fluoreszenzintensitäten. (B) Repräsentativer Zeitverlauf des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten (F Verhältnis) während der Applikation von 1 μM Rotenon unter Kontrollbedingungen (schwarz) und nach Vorinkubation mit 20 μM NS309 (blau) oder 20 μM NS309 + 1 μM Apamin (magenta). (C) Quantifizierung des F Verhältnisses nach 5 Min ohne Rotenon-Applikation (Kontrolle), mit Rotenon-Applikation und mit Rotenon-Applikation nach Vorinkubation mit 20 μM NS309 oder 20 μM NS309 + 1 μM Apamin (n = jeweils 13 Zellen). *: P ≤ 0,05 im Vergleich zur Kontrolle; #: P ≤ 0,05 im Vergleich zur Kontrolle + Rotenon; n.s.: Nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle + Rotenon, kalkuliert mittels des Mann-Whitney U Tests.

Die Quantifizierung des F Verhältnisses nach 5 Minuten bestätigte das durch Rotenon Gabe signifikant ansteigende Level an intrazellulärem freiem Ca²⁺. Interessanterweise konnte die vorherige Aktivierung von SK Kanälen mit NS309 jedoch die Rotenon induzierte Ca²⁺ Überladung der LC Neurone nahezu vollständig verhindern (n = jeweils 13 Zellen). Die gleichzeitige Inhibition plasmamembranständiger SK Kanäle durch Apamin führte zu einer tendenziellen, jedoch nicht vollständigen Aufhebung des NS309 vermittelten Effektes (Abbildung 3.18 C).

3.4.3.3 Antagonisierung der Rotenon bedingten Depolarisation von LC Neuronen im Hirnschnittpräparat

Die Calcium Imaging Experimente zeigten, dass die Rotenon Exposition isolierter LC Neurone einen massiven Ca²⁺ Influx auslöste, welcher durch eine vorherige SK Kanal Aktivierung verhindert werden konnte (Abbildung 3.18). Aufgrund dieser Ergebnisse lag die Vermutung nahe, dass Rotenon durch eine Ca²⁺ vermittelte Depolarisation des Membranpotenzials die intrinsische Schrittmacheraktivität von LC Neuronen beeinflussen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die AP-Abfolgen von LC Neuronen im akuten Hirnschnitt mittels der Gramicidin-Perforated-Patch Konfiguration im *Current-Clamp* Modus unter Kontrollbedingungen (Inkubation in ACSF) und nach zweistündiger Vorinkubation der Hirnschnitte mit 1 μM Rotenon beziehungsweise mit 1 μM Rotenon und 20 μM NS309

aufgenommen. Zunächst fiel auf, dass sowohl nach der Vorinkubation mit Rotenon allein als auch nach der simultanen Vorinkubation mit NS309 nur noch 50% der gemessenen Neurone intrinsische APs generierten, während 91% der Kontrollzellen spontanaktiv waren (Kontrolle, $n = 11$; Rotenon, $n = 10$; Rotenon+NS309, $n = 11$) (nicht gezeigt). Abbildung 3.19 A zeigt repräsentative Messungen spontanaktiver Neurone unter Kontrollbedingungen (schwarz), nach Vorinkubation mit Rotenon (rot) und nach Vorinkubation mit Rotenon und NS309 (blau). Die AP-Frequenz der Rotenon exponierten Neurone war im Vergleich zu Kontrollmessungen signifikant von $1,8 \pm 0,2$ Hz auf $3,9 \pm 0,4$ Hz erhöht (Abbildung 3.19 A und D). Bei Rotenon-Exposition und gleichzeitiger Aktivierung von SK Kanälen durch NS309 kam es hingegen nicht zu einer Frequenzsteigerung ($1,4 \pm 0,1$ Hz) (Abbildung 3.19 A und D). Um aufzuklären, ob diese Frequenzsteigerung durch eine Rotenon bedingte Depolarisation zustande kommen könnte, wurde das Membranpotenzial der LC Neurone untersucht.

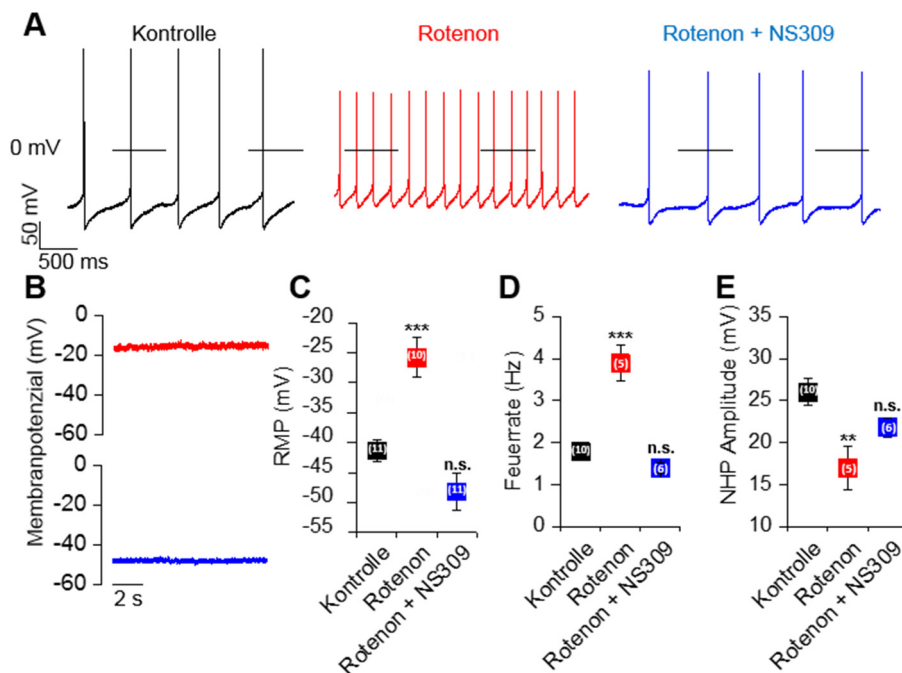


Abbildung 3.19: NS309 antagonisiert die Rotenon induzierte Depolarisation und Frequenzsteigerung von LC Neuronen im akuten Hirnschnittpräparat.

AP-Abfolgen juveniler LC Neurone wurden in der *Perforated-Patch Current-Clamp* Konfiguration aufgenommen. **(A)** Repräsentative AP-Abfolgen spontanaktiver LC Neurone unter Kontrollbedingungen (schwarz) und nach Vorinkubation für 2h mit $1 \mu\text{M}$ Rotenon (rot) oder $1 \mu\text{M}$ Rotenon und $20 \mu\text{M}$ NS309 (blau). **(B)** Repräsentative Messungen des Membranpotenzials von LC Neuronen, die keine intrinsischen APs zeigten (rot = Vorinkubation mit $1 \mu\text{M}$ Rotenon, blau = Vorinkubation mit $20 \mu\text{M}$ NS309; jeweils 50 % inaktive Neurone). **(C)** Vergleich des Membranpotenzials (RMP) aller gemessenen Neurone. Das RMP wurde als mittleres Potenzial definiert um welches die Spannung im Verlauf der Aktionspotenzialabfolge fluktuierte. Die Rotenon-Exposition führte zu einer signifikanten Depolarisation des Membranpotenzials. Bei gleichzeitiger NS309 Vorinkubation trat dieser Effekt nicht auf (Kontrolle, $n = 11$; Rotenon, $n = 10$; Rotenon+NS309, $n = 11$). **(D)** Quantifizierung der Feuerrate der spontanaktiven LC Neurone. Die Inkubation mit Rotenon führte zu einer 2,2 fachen Frequenzsteigerung im Vergleich zu Kontrollzellen und Zellen, die simultan mit NS309 inkubiert wurden. **(E)** Analyse der Nachhyperpolarisation (NHP). Rotenon verkleinerte die NHP Amplitude signifikant von $-26,2 \pm 1,6$ mV in Kontrollmessungen auf $17,0 \pm 2,5$ mV, bei gleichzeitiger NS309 Vorinkubation entsprach die NHP Amplitude in etwa derjenigen von Kontrollzellen ($-23 \pm 1,2$ mV). (D-E: Kontrolle, $n = 10$; Rotenon, $n = 5$; Rotenon+NS309, $n = 6$). n.s.: Nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle, **: $P \leq 0,01$, ***: $P \leq 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle, kalkuliert mittels des ungepaarten Student's T-Tests.

Es fiel auf, dass die Neurone, die nach Inkubation mit Rotenon nicht mehr spontanaktiv waren, ein stark depolarisiertes Membranpotenzial von $-19,0 \pm 4,5$ mV aufwiesen (Abbildung 3.19 B, oben). Die Neurone, die nach simultaner Inkubation mit Rotenon und NS309 keine Spontanaktivität zeigten, hatten im Gegensatz dazu jedoch ein hyperpolarisiertes Membranpotenzial von $-55,3 \pm 3,3$ mV (Abbildung 3.19 B, unten). Die Quantifizierung des Membranpotenzials aller Zellen ergab, dass die Rotenon Exposition zu einer signifikanten Verschiebung des Membranpotenzials von $-41 \pm 1,7$ mV in Kontrollzellen ($n = 11$) auf $-26 \pm 3,3$ mV ($n = 10$) führte. Nach gleichzeitiger Aktivierung von SK Kanälen war das Membranpotenzial tendenziell zu negativeren Werten verschoben ($-48 \pm 3,1$ mV, $n = 11$), unterschied sich aber nicht signifikant von den Kontrollmessungen (Abbildung 3.19 C). Neben der Verschiebung des Membranpotenzials führte die Vorinkubation mit Rotenon des Weiteren zu einer signifikant verkleinerten Nachhyperpolarisation mit einer Amplitude von $-17 \pm 2,6$ mV ($n = 5$) im Vergleich zu Kontrollzellen ($-26 \pm 1,6$ mV, $n = 10$). Die gleichzeitige Aktivierung von SK Kanälen hob diesen Effekt auf ($-23 \pm 1,2$ mV, $n = 6$) (Abbildung 3.19 E).

Aufgrund der antagonisierenden Wirkung von NS309 ließen die zuvor beschriebenen Daten vermuten, dass der Rotenon Effekt auf eine funktionelle Einschränkung von SK Kanälen in LC Neuronen zurückzuführen sein könnte. Im Folgenden wurden daher *Whole-Cell Voltage-Clamp* Messungen ohne und mit Vorinkubation mit 1 μ M Rotenon beziehungsweise mit 1 μ M Rotenon und 20 μ M NS309 durchgeführt. Die Stromantworten auf das wie in Abschnitt 3.4.2.1 beschriebene, für die Messung SK Kanal vermittelter Ströme optimierte Spannungsprotokoll wurden aufgezeichnet (vergl. Einsatz in Abbildung 3.20 A).

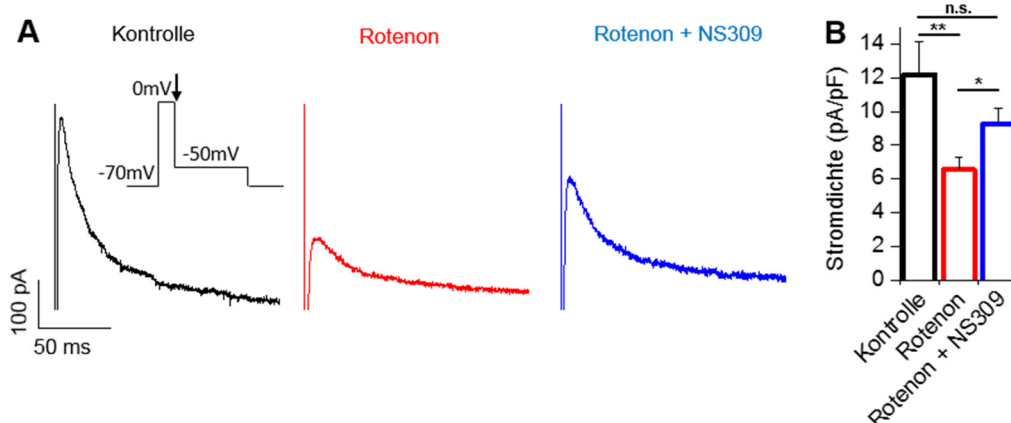


Abbildung 3.20: Rotenon reduziert den SK Kanal vermittelten K⁺ Efflux.

(A) Repräsentative Stromantworten in der *Whole-Cell Voltage-Clamp* Konfiguration auf einen Spannungssprung zu -50 mV (siehe Einsatz) unter Kontrollbedingungen (schwarz), nach 2 h Vorinkubation mit 1 μ M Rotenon (rot) oder mit 1 μ M Rotenon und 20 μ M NS309 (blau). (B) Quantifizierung des auf die jeweilige Zellgröße normalisierten maximalen Stromes am Beginn des Spannungssprungs zu -50 mV. Rotenon reduzierte die maximale Stromdichte von $9,8 \pm 1,2$ pA/pF in Kontrollzellen auf $5,6 \pm 0,9$ pA/pF, bei zusätzlicher NS309 Applikation betrug die Stromdichte $9,3 \pm 0,9$ pA/pF (Kontrolle, $n = 6$; Rotenon, $n = 9$; Rotenon+NS309, $n = 10$). n.s.: Nicht signifikant; *, bedeutet $P \leq 0,05$; **, bedeutet $P \leq 0,01$ kalkuliert mittels des ungepaarten Student's T-Tests.

In Abbildung 3.20 A sind repräsentative K^+ Auswärtsströme illustriert, die unter den drei Bedingungen als Antwort auf den Spannungssprung zu -50 mV aufgezeichnet wurden (siehe Pfeil im eingesetzten Spannungsprotokoll). Die Analyse der auf die Zellgröße normalisierten maximalen Ströme ergab, dass die zweistündige Vorinkubation mit Rotenon die Stromdichte signifikant von $12,2 \pm 1,9$ pA/pF in Kontrollzellen ($n = 6$) auf $6,6 \pm 0,7$ pA/pF ($n = 9$) reduzierte (Abbildung 3.20 A-B). Die gleichzeitige Aktivierung von SK Kanälen mit NS309 verhinderte diese drastische Stromreduktion, in diesem Fall wurde kein signifikanter Unterschied zur Stromdichte von Kontrollzellen festgestellt ($9,3 \pm 0,9$ pA/pF, $n = 10$) (Abbildung 3.20 A-B).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Subramaniam *et al.* wurde beschrieben, dass die Feuerrate dopaminerger Neurone der SNpc in einem transgenen Mausmodell der Parkinson Erkrankung durch die oxidative Modulation von Kaliumkanälen der Untereinheit Kv4.3 erhöht ist (Subramaniam *et al.*, 2014). In Abschnitt 3.2.2 wurde die Expression dieser Kaliumkanal-Untereinheit auch in LC Neuronen nachgewiesen. Des Weiteren wurde die Expression von Kv beta Untereinheiten gezeigt, welche ebenfalls unter veränderten Redox-Bedingungen einen veränderten Kaliumstrom durch Kv1 Kanäle bedingen können (Wang *et al.*, 1996). Um zu überprüfen, ob neben der Modulation des SK Kanal vermittelten Stromes auch die Modulation des transienten Kaliumauswärtsstromes (I_{to}) für den depolarisierenden und frequenzsteigernden Effekt der Rotenon Exposition verantwortlich sein könnte, wurden die Stromantworten auf einen depolarisierenden Spannungssprung zu 0 mV analysiert.

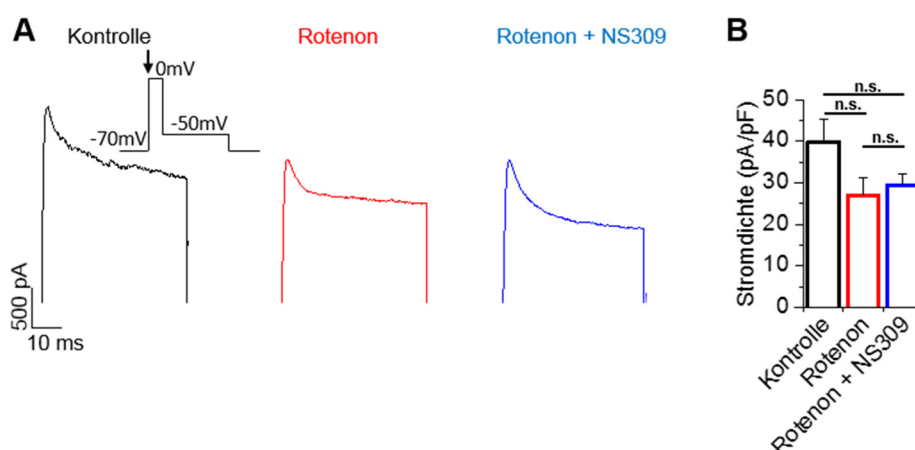


Abbildung 3.21: Die Rotenon Exposition reduziert den I_{to} .

(A) Beispielhafte Stromantworten in der *Whole-Cell Voltage-Clamp* Konfiguration auf den Spannungssprung zu 0 mV (siehe Pfeil im eingesetzten Spannungsprotokoll) unter Kontrollbedingungen (schwarz), nach 2 h Vorinkubation mit 1 μ M Rotenon (rot) oder mit 1 μ M Rotenon und 20 μ M NS309 (blau). Die Amplitude des Spitzenstroms (I_{to}) war sowohl nach Rotenon, als auch nach Rotenon + NS309 Vorinkubation verkleinert. (B) Quantifizierung der Stromdichte am Beginn des Spannungssprungs zu 0 mV. Rotenon führte tendenziell ($P=0,09$) zu einer Verkleinerung der Stromdichte von $39,7 \pm 5,7$ pA/pF in Kontrollzellen auf $27 \pm 4,3$ pA/pF, auch bei zusätzlicher NS309 Administration blieb diese tendenzielle Stromreduktion erhalten ($29,4 \pm 2,8$ pA/pF, $P = 0,09$ im Vergleich zu Kontrollzellen) (Kontrolle, $n = 6$; Rotenon, $n = 9$; Rotenon+NS309, $n = 10$). n.s.: Nicht signifikant, die statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student's T-Tests kalkuliert.

Wie in den repräsentativen Messungen in Abbildung 3.21 A illustriert, zeigten Zellen aller drei Bedingungen eine transiente (I_{to}) und eine anhaltende Stromkomponente. Der mittlere transiente Spitzenstrom erreichte unter Kontrollbedingungen eine Amplitude von $2,3 \pm 0,3$ nA, nach Rotenon Exposition lediglich $1,4 \pm 0,2$ nA und bei simultaner Rotenon und NS309 Inkubation ebenfalls nur $1,7 \pm 0,2$ nA. Die anschließende Analyse der Stromdichte ergab einen Wert von $39,7 \pm 5,7$ pA/pF für Kontrollzellen ($n = 6$). Nach Vorinkubation mit Rotenon war die Stromdichte im Vergleich zu den Kontrollmessungen tendenziell reduziert, erreichte aber keine statistische Signifikanz ($27 \pm 4,3$ pA/pF, $n = 9$). Nach gleichzeitiger Rotenon Exposition und Aktivierung von SK Kanälen mit NS309 blieb die Stromdichte des I_{to} ebenfalls tendenziell reduziert ($29,4 \pm 2,8$ pA/pF, $n = 10$) (Abbildung 3.21 B). Dass NS309 in diesem Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Stromamplitude des I_{to} hatte, bestätigte dessen selektive Wirkung auf die SK Ionenkanalfamilie.

3.4.3.4 Die SK Kanal Aktivierung wirkt protektiv im in vitro Rotenon-Toxizitäts-Modell

Die Ergebnisse des Calcium Imaging und der Patch-Clamp Untersuchungen zeigten, dass die Aktivierung von SK Kanälen der durch Rotenon verursachten Depolarisation und Frequenzsteigerung sowie der zytotoxischen Ca^{2+} Überladung coerulärer Neurone entgegenwirken kann. Im Folgenden sollte daher die potentielle neuroprotektive Wirkung der SK Kanal Aktivierung auf Neurone des LC mittels stereologischer Analyse überprüft werden. Hierzu wurden 20 Hirnblöcke, die den LC enthielten, zunächst für eine Stunde in ACSF oder ACSF, die mit $20 \mu\text{M}$ NS309 komplementiert war, vorinkubiert. Anschließend wurde diese Inkubation entweder für weitere vier Stunden fortgeführt (Kontrolle) oder $1 \mu\text{M}$ Rotenon hinzugegeben. Nach anschließender Fixierung wurden Mittelhirnschnitte angefertigt und auf ihre Tyrosinhydroxylase-Immunoreaktivität (TH-IR) überprüft. Abbildung 3.22 illustriert Lichtbilder repräsentativer LC Regionen in 5 facher Vergrößerung. Nach Inkubation in ACSF und in ACSF mit NS309 ergab sich ein ähnliches Bild dicht gepackter TH-positiver Neurone. Nach vierstündiger Inkubation mit Rotenon war die TH-Immunoreaktivität deutlich verringert (Abbildung 3.22, unten rechts). Bei Präinkubation mit NS309 blieb die TH-Immunoreaktivität auch nach Rotenon-Exposition erhalten (Abbildung 3.22, unten links).

Um die Gesamtzahl TH-postiver Neurone im LC zu quantifizieren wurden die Hirnschnitte stereologisch mittels der „Optical Fractionator“ – Methode analysiert. Hierbei wurde die Gesamtzahl der Neurone innerhalb des LC durch Auszählen einer Teilmenge mathematisch abgeschätzt. Nur vitale Neurone, die definierten Kriterien entsprachen, wurden gezählt (vergleiche Abschnitt 2.4.4.2).

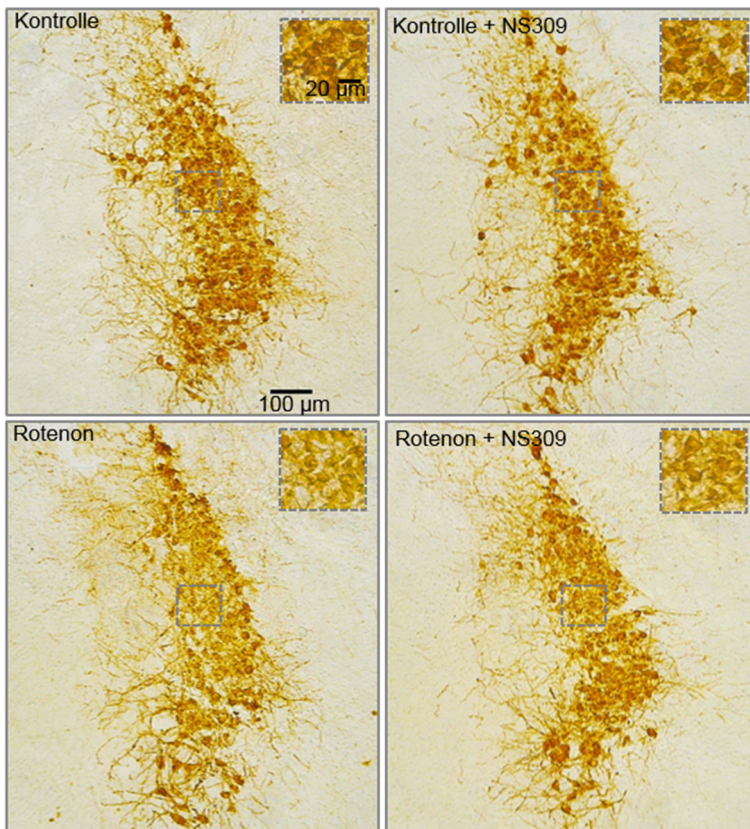


Abbildung 3.22: Die SK Kanal Aktivierung mit NS309 schützt vor Rotenon bedingtem Zellverlust des LC.

Illustriert sind repräsentative Mikroskopiebilder der jeweils rechten LC Regionen DAB-gefärbter Mittelhirnschnitte. Hirnblöcke, die den LC enthielten, wurden zunächst für eine Stunde in ACSF mit oder ohne 20 μ M NS309 inkubiert und entweder als Kontroll-Experimente für weitere 4 h nur in ACSF oder ACSF mit NS309 (oben) oder in ACSF mit zusätzlich 1 μ M Rotenon (unten) inkubiert. Die Hirnblöcke wurden in Paraformaldehyd fixiert, 30 μ M Schnitte angefertigt und die LC Neurone anhand der Immunoreaktivität für das Markerenzym Tyrosinhydroxylase (TH) mittels DAB-Färbung identifiziert. Bemerkenswert ist der Zellverlust in Rotenon behandelten Schnitten, welcher bei gleichzeitiger SK Kanal Aktivierung mit NS309 weniger ausgeprägt ist.

Der LC muriner Gehirne, die unter Kontrollbedingungen in ACSF inkubiert wurden, umfasste 2548 ± 227 TH positive Neurone ($n = 5$) (Abbildung 3.23). Dies ist konsistent zu den in der Literatur beschriebenen Werten (O'Neil *et al.*, 2007). Nach Rotenon Exposition war eine deutliche Neurodegeneration anhand einer signifikant reduzierten Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen (Rotenon: 1800 ± 160 TH-IR Neurone, $n = 5$) (Abbildung 3.23). Bemerkenswert war, dass die Präinkubation mit NS309 diesen Rotenon bedingten Zellverlust nahezu vollständig verhinderte (2365 ± 207 TH-IR Neurone, $n = 5$). Bei alleiniger Inkubation mit NS309 war kein Unterschied zur Kontrolle detektierbar ($2582 \pm 195,5$ TH-IR Neurone, $n = 5$) (Abbildung 3.23).

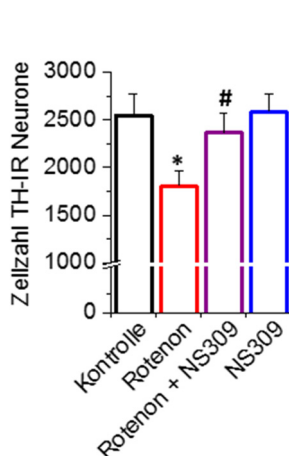


Abbildung 3.23: Die SK Kanal Aktivierung mit NS309 schützt vor Rotenon bedingtem Zellverlust des LC.

Stereologische Quantifizierung der Anzahl TH-immunoreaktiver (TH-IR) Neurone im LC. Das Auszählen wurde unter verblindeten Bedingungen mittels der „Optical Fractionator“ – Methode bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Als Zählkriterien für vitale Neurone wurden die Immunoreaktivität, der erkennbare Nukleus, sowie die definierte Lage innerhalb des Zählrahmens festgelegt (vergleiche Abschnitt 2.4.4.2). Der LC muriner Hirne, die 5 h in ACSF inkubiert wurden, bestand aus 2548 ± 227 Zellen (schwarz). Auch bei Inkubation in ACSF mit 20 μ M NS309 lag die Zellzahl in einem ähnlichen Bereich (2582 ± 196 , blau). Nach Inkubation mit 1 μ M Rotenon war die Zellzahl signifikant auf 1800 ± 160 verringert (rot). Diese Neurodegeneration wurde durch gleichzeitige SK Kanal Aktivierung mit NS309 verhindert (2365 ± 207 Zellen, violett) ($n =$ jeweils 5 Hirne). *, bedeutet $P < 0.05$, im Vergleich zur Kontrolle; #, bedeutet $P < 0.05$, im Vergleich zu Rotenon). Die statistische Signifikanz wurde mittels der einfaktoriellen ANOVA gefolgt vom Tukey's Post-hoc Test ermittelt.

4. DISKUSSION

4.1 Elektrophysiologischer Phänotyp und Ionenkanalexpression der LC

Neurone

Das pontine Tegmentum beherbergt neben dem LC eine Vielzahl weiterer Kerngebiete. So grenzen direkt lateral an die LC- Region der glutamaterge Nucleus mesencephalicus nervi trigemini sowie der cholinerge laterodorsale tegmentale Nucleus (Allen *et al.*, 2015). Um zu gewährleisten, dass innerhalb dieser Arbeit ausschließlich noradrenerge LC Neurone in die Analyse einbezogen wurden, wurden immunhistochemische, molekularbiologische sowie elektrophysiologische Kriterien zur Identifikation der LC Neurone angewendet.

4.1.1 LC Neurone sind autonome Schrittmacher

Während der *Whole-Cell* Messungen im akuten Hirnstammschnitt konnte ein charakteristisches Aktivitätsmuster der LC Neurone aufgezeichnet werden. Die hier beobachtete intrinsische Schrittmacheraktivität in einem Frequenzbereich von 2 -4 Hz und die breiten APs stimmen mit den Ergebnissen früherer Studien überein (Sanchez-Padilla *et al.*, 2014). Erstmals wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit außerdem diverse weitere AP-Charakteristika juveniler LC Neurone, wie die Amplitude der Nachhyperpolarisation, die AP-Höhe und das Schwellenpotenzial quantifiziert (vgl. Tabelle 3.1). Der elektrophysiologische Phänotyp wurde stets mit der immunohistochemisch nachgewiesenen Expression des Markerenzym der Katecholamin-Synthese, Tyrosinhydroxylase, korreliert (vgl. Abbildung 3.2). Diese Ergebnisse können daher dazu dienen in zukünftigen Untersuchungen direkt von den elektrophysiologischen Eigenschaften auf die noradrenerge Identität eines LC Neurons zu schließen.

Im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen, wie der PD, ist es wichtig die Mechanismen der elektrischen Aktivität der LC Neurone zu verstehen, da diese direkt an intrazelluläre Überlebens-Signalwege gekoppelt ist. Auch die Neurone weiterer, während der PD Pathogenese betroffener Kerngebiete, wie der DMV und die SNpc, sind spontane Schrittmacher in einem ähnlichen Frequenzbereich wie die des LC (Goldberg *et al.*, 2012, Guzman *et al.*, 2009). Die potenziell zytotoxischen Folgen dieser Schrittmacheraktivität werden in Abschnitt 4.2 und 4.3 diskutiert. Die überaus regelmäßige Generierung von APs bedingt, dass das Membranpotenzial der LC Neurone um einen relativ depolarisierten Wert von -43 mV fluktuiert- ein weiterer Faktor, der zur selektiven Vulnerabilität dieser Neuronengruppe beitragen könnte. Obwohl bereits diverse Ionenströme in LC

Neuronen beschrieben wurden (de Oliveira *et al.*, 2010, Sanchez-Padilla *et al.*, 2014, Williams *et al.*, 1984), geht nicht aus der Literatur hervor, welche Ströme primär dem Schrittmachermechanismus der LC Neurone unterliegen und die AP Charakteristika bedingen.

4.1.2 Ionenkanal Expressionsprofil der LC Neurone

Mit Hilfe der in Abschnitt 2.2.4 beschriebenen RT-PCR Technik konnte in dieser Arbeit erstmals die molekulare Identität von Ionenkanälen aufgeklärt werden, die der elektrischen Aktivität der LC Neurone unterliegen könnten. Um potenzielle Parallelen aufzuzeigen wurde hier ein Fokus auf Ionenkanäle gelegt, die in anderen von der PD Pathogenese betroffenen Hirngebieten (SNpc, DMV) bereits beschrieben wurden: i) die kaliumselektiven Ionenkanäle (Subramaniam *et al.*, 2014, Liss *et al.*, 2001), ii) die spannungsgesteuerten Ca^{2+} Kanäle (Goldberg *et al.*, 2012, Guzman *et al.*, 2009) und iii) die Ca^{2+} aktivierten Kaliumkanäle (Wolfart *et al.*, 2001).

In früheren elektrophysiologischen Studien an LC Neuronen der Ratte konnten sowohl schnell inaktivierende K^+ Ströme vom A-Typ (Williams *et al.*, 1984, Forsythe *et al.*, 1992), als auch langsam inaktivierende K^+ Ströme vom *delayed rectifier* Typ (Murai und Akaike, 2005) nachgewiesen werden. Auch innerhalb meiner Diplomarbeit konnte ich einen K^+ Strom in LC Neuronen auflösen, der eine transiente A-Typ Komponente mit einer Inaktivierungszeitkonstanten von 3,79 ms und eine persistierende Komponente aufweist (Matschke, 2011). A-Typ Ströme werden durch die Kaliumkanal-Untereinheiten Kv1.4 und Kv4.3 generiert (Snyders, 1999). Wie in der Einleitung beschrieben, können jedoch auch Kaliumkanäle vom *delayed rectifier* Typ durch Assemblierung mit Kv β 1 Untereinheiten in A-Typ Kanäle konvertiert werden (Rettig *et al.*, 1994). Innerhalb der vorliegenden Studie wurde die Expression einer Vielzahl von Untereinheiten kaliumselektiver Ionenkanäle in juvenilen LC Neuronen der Maus detektiert (vgl. Abbildung 3.4 und 3.5). Innerhalb der Gruppe der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle war auffällig, dass sowohl die Expression der A-Typ Strom vermittelnden Untereinheiten Kv1.4 und Kv4.3 als auch die kombinierte Expression von Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5 und Kv1.6 mit Kv β 1 Untereinheiten nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 3.4). Die in der Literatur beschriebene schnelle Inaktivierungskinetik der transienten K^+ Strom Komponente ist konsistent mit der in der vorliegenden Arbeit detektierten kombinierten Expression von Untereinheiten der Kv1 Familie mit Kv β 1 Untereinheiten und Kv1.4 Untereinheiten. Das Expressionsprofil zeigt weiterhin, dass der persistierende Anteil des K^+ Stroms höchstwahrscheinlich durch Kaliumkanäle vermittelt wird, die Kv1 oder Kv2.1 Untereinheiten beinhalten. In Neuronen mit intrinsischer Schrittmacheraktivität, darunter auch dopaminerge Neurone der SNpc, können A-Typ Ströme regulierend auf die AP Frequenz wirken (Liss *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführte molekulare Charakterisierung des I_A kann

als Grundlage für weitere elektrophysiologische Studien dienen und so maßgeblich zum Verständnis des Schrittmachermechanismus von LC Neuronen beitragen.

Neben der molekularen Identität der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit außerdem erstmals ein Expressionsprofil der GIRK- und K₂P Kanäle muriner LC Neurone erstellt werden (vgl. Abbildung 3.5). Während in dieser Studie lediglich Amplifikate der GIRK Kanal Untereinheiten GIRK-1 und GIRK-4 detektiert wurden, konnten Kawano *et al.* mittels Einzelzell RT-PCR Analysen kultivierter Ratten LC Neurone außerdem die Expression von GIRK-2 sowie zu einem geringeren Anteil von GIRK-3 nachweisen (Kawano *et al.*, 2004). Dieser scheinbare Widerspruch ist jedoch mit Speziesunterschieden einerseits sowie mit dem Prozess der Kultivierung, welcher zu einer veränderten Genexpression führen kann, andererseits zu erklären. Die Ergebnisse der murinen LC Neurone unterscheiden sich von denen dopaminergener Neurone der SNpc, in welchen die Expression von GIRK-2, jedoch nicht von GIRK-1 nachgewiesen wurde (Inanobe *et al.*, 1999). Bezüglich der K₂P Kanäle wurden in dieser Studie Amplifikate der Untereinheiten TASK-1, TASK-3, TASK-5 sowie THIK-2, TWIK-1, TREK-1 und TRAAK nachgewiesen (vgl. Abbildung 3.5). K₂P Kanäle sind an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials zentraler Neurone beteiligt und vermitteln die inhibitorische Wirkung der Inhalationsanästhetika. Von den acht, im Säugetier funktionalen K₂P Kanälen werden jedoch nur TASK-1, TASK-2 und TREK-1 Kanäle durch Inhalationsanästhetika aktiviert (Gray *et al.*, 2000, Patel *et al.*, 1999). In einer elektrophysiologischen Studie von Sirois *et al.* wurde die Aktivierung des TASK-1 Kanals durch das Inhalationsanästhetikum Halothan in LC Neuronen der Ratte nachgewiesen (Sirois *et al.*, 2000). Aufgrund des in dieser Arbeit erstellten Expressionsprofils kann postuliert werden, dass Inhalationsanästhetika auch auf murine LC Neurone über die Aktivierung von TASK-1 wirken. Zusätzlich könnte außerdem TREK-1 an diesem Mechanismus beteiligt sein. Zur Aufklärung der Funktion der anderen in LC Neuronen exprimierten K₂P Kanal Untereinheiten bedarf es weiterer elektrophysiologischer Untersuchungen.

4.1.3 Limitationen der RT-PCR Expressionsanalyse

Die Aussagekraft der mittels der RT-PCR erhaltenen Ergebnisse hängt maßgeblich von der Reinheit des cDNA-Pools einerseits und von der Reproduzierbarkeit und Sensitivität dieser Methode andererseits ab. Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, wurde jeder cDNA Pool vor seiner Weiterverwendung auf die Expression der katecholaminergen Markerenzyme überprüft und die Expression GABAerger Markerenzyme ausgeschlossen (vgl. Abbildung 3.3). Aufgrund der multiplen Eingänge des LC ist es jedoch möglich, dass Anteile nicht noradrenerger Neurone (zum Beispiel Axonendigungen) während der Gewinnung aus dem Hirnschnittpräparat mit aufgenommen und in die Analyse einbezogen wurden. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass die in diesen Endigungen enthaltene mRNA hoch

genug konzentriert war um mit dem hier verwendeten PCR Protokoll detektiert werden zu können und so die Ergebnisse zu verfälschen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen wäre Einzelzell RT-PCRs durchzuführen. Bei dieser Methode muss jedoch eine genügend hohe Effizienz der reversen Transkription sowie die Möglichkeit der PCR-Amplifikation einzelner DNA-Moleküle gewährleistet sein. Wenn die Sensitivität der Einzelzell PCR Methode nicht optimal ist, birgt sie die Gefahr, dass ein PCR-Signal trotz Expression des entsprechenden Gens in der untersuchten Zelle negativ ausfällt (Mermelstein *et al.*, 1998).

Durch mehrfache Sequenzierung der PCR-Produkte wurde die Spezifität der innerhalb dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer verifiziert, so dass positive PCR Signale als eindeutig angesehen werden konnten, wenn in der entsprechenden Negativkontrolle keine Amplifikate nachgewiesen wurden. Durch die Verwendung intron-überspannender Primer wurden außerdem falsch-positive PCR-Signale, welche durch Amplifikation genomischer DNA entstehen könnten, ausgeschlossen. Obwohl in jedem PCR Ansatz die cDNA eines Pools von 10-15 LC Neuronen verwendet wurde und die DNA-Konzentration somit für die Amplifikation ausreichen sollte, ist die Beurteilung negativer PCR Signale auch hier trotz eindeutiger Positivkontrolle problematisch. Bei sehr geringer Expression des jeweiligen Gens kann es sein, dass die Sensitivität des hier verwendeten PCR-Protokolls nicht ausreichte und cDNA Moleküle eventuell „übersehen“ wurden. Da die Ergebnisse der Expressionsanalysen jedoch mit unterschiedlichen LC Neuronen-Pools durchgeführt wurden und stets reproduzierbar waren, ist diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich.

Eine wichtige Limitation der RT-PCR Expressionsanalyse ist, dass lediglich die Expression eines Gens auf Transkript-Ebene, nicht aber die funktionelle Expression des korrespondierenden Proteins angezeigt wird. Um eine funktionelle Aussage zu treffen ist eine Kombination dieser Methode mit elektrophysiologischen oder immunhistochemischen Techniken daher von großem Vorteil.

4.2 Das Zusammenspiel von L-Typ und T-Typ Ca^{2+} Kanälen reguliert den Schrittmachermechanismus muriner LC Neurone

Im vergangenen Jahrzehnt wurden umfangreiche Studien durchgeführt, die die Rolle von „low-voltage“ aktivierten L-Typ Ca^{2+} Kanälen -Cav1.3 Kanälen- hinsichtlich des Schrittmachermechanismus und des aktivitätsbedingten oxidativen Stresses von Neuronen der SNpc, des DMV und des LC beleuchteten (Chan *et al.*, 2007, Sanchez-Padilla *et al.*, 2014, Goldberg *et al.*, 2012). Die Rolle der T-Typ Ca^{2+} Kanäle -Cav3 Kanäle- in LC Neuronen, welche ebenfalls bei negativen Membranpotenzialen aktivieren, wurde hingegen bislang nicht untersucht. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass neben L-Typ Ca^{2+} Kanälen auch T-Typ Ca^{2+} Kanäle in murinen LC Neuronen exprimiert und funktionell relevant sind. Aus den hier vorgestellten Ergebnissen können drei

wesentliche Schlüsse gezogen werden. Erstens, LC Neurone exprimieren sowohl Cav1.2 und Cav1.3 als auch alle Untereinheiten der Cav3 Familie, weshalb der Ca^{2+} Strom dieser Neurone eine ausgeprägte „low-voltage“ aktivierte Komponente aufweist. Zweitens, obwohl weder L-Typ noch T-Typ Ca^{2+} Kanäle allein die Schrittmacheraktivität der LC Neurone beeinflussen, wird die Feuerrate durch das Zusammenspiel dieser Kanäle reguliert. Drittens, T-Typ Ca^{2+} Kanäle sollten neben den „low-voltage“ aktivierten L-Typ Ca^{2+} Kanälen als Kandidaten in Betracht gezogen werden, die aktivitätsabhängigen oxidativen Stress im Kontext pathologischer Bedingungen vermitteln könnten.

4.2.1 LC Neurone exprimieren funktionelle „low-voltage“ aktivierte Ca^{2+} Kanäle

Die erste Beschreibung von Ca^{2+} Kanal vermittelten Strömen in LC Neuronen erfolgte im Jahre 1999 durch Chieng *et al.*. Durch die Kombination elektrophysiologischer und pharmakologischer Methoden konnten in dieser Studie Ba^{2+} Ströme in dissoziierten LC Neuronen der Ratte isoliert werden, die durch L- N- und P/Q/R-Typ Ca^{2+} Kanäle vermittelt werden (Chieng und Bekkers, 1999). Später beschrieb eine weitere Gruppe, dass die Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} Kanälen Bestandteil des Mechanismus der Chemosensation in Ratten LC Neuronen ist (Filosa und Putnam, 2003a). Den Hinweis auf eine Expression der Cav1.3 Untereinheit in LC Neuronen lieferte die Behandlung genveränderter Mäuse, welche Dihydropyridin-insensitive Cav1.2 Kanäle exprimieren. Die Gabe des Kanal Aktivators Bay k 8644 führte in diesen Mäusen dennoch zu einer, auf die Aktivierung von Cav1.3 Kanälen zurückzuführenden, erhöhten FOS-Expression und damit zu einer erhöhten neuronalen Aktivität (Hetzenauer *et al.*, 2006). In einer jüngeren Studie zeigen Sanchez-Padilla *et al.*, dass murine LC Neurone die L-Typ Ca^{2+} Kanal Untereinheiten Cav1.2 und Cav1.3 exprimieren und dass diese Kanäle Ca^{2+} Oszillationen mit gleicher Frequenz wie die der intrinsischen APs vermitteln (Sanchez-Padilla *et al.*, 2014). Sowohl mittels RT-PCR als auch mittels elektrophysiologischer Untersuchungen wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass LC Neurone außerdem weitere funktionelle „low-voltage“ aktivierte Ca^{2+} Kanäle exprimieren, nämlich die drei Familienmitglieder der Cav3 Gruppe (vgl. Abbildung 3.5). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden in zwei früheren Studien keine Hinweise auf funktionelle T-Typ Ca^{2+} Kanäle gefunden (Chieng und Bekkers, 1999, de Oliveira *et al.*, 2010). Dieser scheinbare Widerspruch ist jedoch mit den unterschiedlichen methodischen Ansätzen dieser Studien zu erklären. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Messungen im akuten Hirnstammschnitt analysierten Chieng *et al.* dissoziierte LC Neurone der Ratte. Sowohl Speziesunterschiede als auch der Prozess der Dissoziation können ein verändertes Ca^{2+} Strom Profil bedingen. So wurde beschrieben, dass thalamische Neurone innerhalb akuter Hirnschnitte signifikant größere T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelte Ströme aufweisen als dissoziierte Neurone. Dies ist wahrscheinlich auf den Verlust der Dendriten während des Dissoziationsprozesses zurückzuführen

(Destexhe *et al.*, 1998). Des Weiteren nutzten Chieng *et al.* die Neurone von Ratten im Alter von drei bis neun Tagen. Da die Expression der L-Typ Ca^{2+} Kanäle in LC Neuronen während der ersten postnatalen Tage stark schwankt (Imber und Putnam, 2012), könnte dies auch für die T-Typ Ca^{2+} Kanäle zutreffen. Die Gruppe um de Oliveira *et al.* nutzte zwar ähnliche Bedingungen (akute murine Hirnschnitte, ähnliche Zusammensetzungen der Messlösungen) wie in der vorliegenden Studie, unterschied sich jedoch hinsichtlich der angewendeten Messprotokolle. Die von de Oliveira *et al.* angewandten langsamen Spannungsrampen könnten nicht geeignet sein um T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelte Ströme aufzulösen. Da T-Typ Ca^{2+} Kanäle aufgrund ihrer schnellen Inaktivierung bei anhaltender Depolarisation nur in einem kleinen Spannungsbereich leitfähig sind (Perez-Reyes, 2003), ist wahrscheinlich, dass die Kanäle während dieser langsamen Spannungsrampe bereits inaktivieren, bevor ein auflösbarer Ca^{2+} Strom fließen kann.

4.2.2 Anteil der L- und T-Typ Ca^{2+} Kanäle am Gesamt Ca^{2+} Strom der LC Neurone

Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen in Kombination mit der pharmakologischen Inhibition von Ca^{2+} Kanal Unterfamilien konnten innerhalb der vorliegenden Arbeit verschiedene Stromkomponenten isoliert werden, die durch „low-voltage“ aktivierte L-Typ und T-Typ Ca^{2+} Kanäle vermittelt werden. Wie in der Einleitung beschrieben, konnte ich in meiner Diplomarbeit zeigen, dass LC Neurone „low-voltage“ aktivierte Ca^{2+} Ströme aufweisen, die bereits bei -74 mV halbmaximal inaktiviert sind ($V_{1/2}$). Dies stimmt mit den in der Literatur beschriebenen $V_{1/2}$ Werten für T-Typ Ca^{2+} Kanäle verschiedener Hirnregionen überein (Perez-Reyes, 2003). Um diese „low-voltage“ aktivierte Stromkomponente weitergehend zu untersuchen wurden in dieser Studie anstatt Ca^{2+} 2 mM Ba^{2+} als Ladungsträger genutzt (siehe Abschnitt 3.3.3). Bei geringen Konzentrationen an Ba^{2+} wird die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Ca^{2+} Kanälen nicht beeinflusst, es bietet aber den Vorteil, dass auch kleine Ca^{2+} Kanal vermittelte Ströme aufgelöst werden können (Klöckner *et al.*, 1999, Klugbauer *et al.*, 1999). Als Pharmaka wurden geringe Konzentrationen von Isradipin und Mibefradil eingesetzt, um die jeweiligen Präferenzen der Substanzen für L- und T-Typ Ca^{2+} Kanäle optimal auszunutzen. Obwohl Isradipin vornehmlich als Blocker von L-Typ Ca^{2+} Kanälen bekannt ist, wirkt es in hohen Konzentrationen auch auf T-Typ Ca^{2+} Kanäle (Perez-Reyes *et al.*, 2009). Die in dieser Studie eingesetzte Isradipin-Konzentration von 120 nM war 25-fach geringer als die IC_{50} für T-Typ Ca^{2+} Kanäle, so dass hier von einem präferentiellen Block der L-Typ Ca^{2+} Kanäle ausgegangen werden kann. Der IC_{50} Wert von Mibefradil für T-Typ Ca^{2+} Kanäle liegt im Bereich von 200 nM und ist damit 12-fach geringer als für L-Typ Ca^{2+} Kanäle (Martin *et al.*, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Mibefradil-Konzentration von 2 μM könnte demnach auch eine partielle Inhibition von L-Typ Ca^{2+} Kanälen bedingen. Es ist jedoch von Bedeutung, dass IC_{50} Werte meist in heterologen Expressionssystemen

bestimmt werden, die effektive Substanz-Konzentration innerhalb eines Hirnschnitt-Präparates durch Diffusions-Effekte aber geringer ist als in der Bad-Lösung. Aus diesem Grund sind Mibefradil vermittelte Effekte auf L-Typ Ca^{2+} Kanäle in diesem Versuchsaufbau unwahrscheinlich. Die in Abbildung 3.7 ermittelten Ergebnisse unterstützen diese Aussage, da die Mibefradil-Applikation zu keiner signifikanten Reduktion des maximalen Stromes bei -10 mV führte. Dies würde auf eine Inhibition von L-Typ Ca^{2+} Kanälen hindeuten. Da in dieser Studie hohe intrazelluläre ATP Konzentrationen verwendet wurden, können auch unspezifische Effekte des Mibefradils auf ATP sensitive K^+ Kanäle (Gomora *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 1999) ausgeschlossen werden. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen war die Auflösung T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelter Ströme nur möglich, wenn das Membranpotenzial der LC Neurone vor dem eigentlichen Spannungsprotokoll hyperpolarisiert wurde (vgl. Abbildung 3.8). Dieser Effekt ist konsistent mit der charakteristischen Eigenschaft der T-Typ Ca^{2+} Kanäle in einem sehr kleinen, hyperpolarisierten Spannungsbereich zu aktivieren und zu inaktivieren (Perez-Reyes, 2003). Aufgrund ihrer schnellen Inaktivierung vermitteln T-Typ Ca^{2+} Kanäle transiente Ströme (Klößner *et al.*, 1999), während L-Typ Ca^{2+} Kanäle langsamer inaktivieren und persistierende Ströme vermitteln (Xu und Lipscombe, 2001). Diese Eigenschaften spiegeln sich in Abbildung 3.8 A wieder. Während Mibefradil selektiv die transiente Stromkomponente reduzierte, blockierte Isradipin sowohl die transiente als auch die persistierende Komponente. Bei Betrachtung der Substanz-sensitiven Differenzströme in Abbildung 3.8 E wird dieser Unterschied noch deutlicher. Der Isradipin-sensitive Differenzstrom zeigte die typische langsame Inaktivierungskinetik von L-Typ Ca^{2+} Kanälen, während der Mibefradil-sensitive Differenzstrom die für T-Typ Ca^{2+} Kanäle charakteristische schnelle Inaktivierungskinetik aufwies. Als Kontrolle wurde in zusätzlichen Experimenten (vgl. Abbildung 3.7 D und Abbildung 3.8 D) der selektive T-Typ Ca^{2+} Kanal Blocker Z944 verwendet (Tringham *et al.*, 2012). Bedeutenderweise zeigten die Mibefradil- und Z944-sensitiven Ströme vergleichbare Charakteristika. Dies unterstützt die Schlussfolgerung, dass es sich bei den Mibefradil-sensitiven Strömen vornehmlich um T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelte Komponenten handelt.

Bei Betrachtung der Stromantworten auf eine schnelle Spannungsrampe in Abbildung 3.8 F fiel auf, dass Isradipin neben einer Stromkomponente bei -10 mV auch eine „low-voltage“ aktivierte Stromkomponente inhibierte. Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Aktivierung bei hyperpolarisierten Membranpotenzialen ein Charakteristikum der Cav1.3 Kanäle (Lipscombe *et al.*, 2004). Es kann daher postuliert werden, dass diese Stromkomponente primär durch Cav1.3 Kanäle vermittelt wird. Da in dieser Arbeit sowohl Cav1.2 als auch Cav1.3 Transkripte in den LC Neuronen nachgewiesen wurden, ist eine generelle Aussage über den relativen Anteil der Cav1.3 und Cav1.2 vermittelten Ströme am Isradipin- sensitiven Strom jedoch nicht möglich. Die Subtyp-Sensitivität des Isradipins wird in der Literatur kontrovers diskutiert und je nach Zelltyp und den exprimierten Splicevarianten variieren die IC_{50} Werte für Cav1.2 und Cav1.3 Kanäle bis zu zehnfach (Xu und

Lipscombe, 2001, Scholze *et al.*, 2001, Abernethy und Soldatov, 2002). Da bislang unbekannt ist, um welche Splicevarianten der Cav1 Kanäle es sich in den Neuronen des LC handelt, kann nicht beurteilt werden, ob die eingesetzte Konzentration von 120 nM Isradipin hier primär Cav1.3 oder Cav1.2 Kanäle inhibiert.

Sowohl Isradipin als auch Mibefradil reduzierten lediglich einen Teil des Gesamt Ca^{2+} Stroms der LC Neurone (vgl. Abbildung 3.7 und 3.8). Es ist wahrscheinlich, dass die verbleibende Stromkomponente maßgeblich durch Ca^{2+} Kanäle der Cav2 Unterfamilie vermittelt wurde, deren Expression in dieser Studie mittels RT-PCR nachgewiesen wurde (vgl. Abbildung 3.6).

4.2.3 Probleme bei der pharmakologischen Isolation L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelter Stromkomponenten

Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit Isradipin und Mibefradil tatsächlich unter den in dieser Studie festgelegten Bedingungen L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelte Stromkomponenten differenzieren können, müssen zwei Aspekte berücksichtigt werden. Erstens, sowohl Isradipin als auch Mibefradil sind allosterische Kanal-Modulatoren, deren Wirkung spannungsabhängig ist (Bean, 1984, Leuranguer *et al.*, 2001, Perchenet *et al.*, 2000). In Abbildung 3.8 wurde das Haltepotenzial mittels eines hyperpolarisierenden Sprunges auf -100 mV geklemmt. Bei diesem hyperpolarisierten Membranpotenzial ist die Affinität des Isradipins für Cav1 Kanäle bis zu tausendfach geringer als bei -20 mV (Bean, 1984). Auch für Mibefradil wurde eine verringerte Affinität für T-Typ Ca^{2+} Kanäle bei hyperpolarisierten Membranpotenzialen gezeigt (Leuranguer *et al.*, 2001). So liegt der IC_{50} des Mibefradils für T-Typ Ca^{2+} Kanäle in atrialen Zellen der Ratte bei 0,1 μM , wenn das Membranpotenzial bei -100 bis -80 mV liegt. Im selben Spannungsbereich beeinflussen 0,1 μM Mibefradil jedoch nicht die L-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelten Ströme ventrikulärer Zellen. Die Depolarisation des Membranpotenzials führt jedoch sowohl zu einer erhöhten Affinität des Mibefradils für T-Typ als auch für L-Typ Ca^{2+} Kanäle (Leuranguer *et al.*, 2001). Dies unterstreicht, dass das in der vorliegenden Studie verwendete Spannungsprotokoll mit hyperpolarisiertem Haltepotenzial, neben der Verwendung geringer Substanz-Konzentrationen, dazu dienen kann L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelte „low-voltage“ aktivierte Stromkomponenten verlässlicher zu unterscheiden. Andererseits kann die unter diesen Bedingungen geringe Mibefradil-Affinität dazu führen, dass die T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelte Stromkomponente unterschätzt wird. Um eine vollständige Inhibition dieser Stromkomponente zu erreichen wären eventuell höhere Mibefradil-Konzentrationen nötig- auf Kosten der Selektivität.

Der zweite zu berücksichtigende Aspekt ist die Wahl der Substanzkonzentrationen. Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, beschreiben Martin *et al.* eine IC_{50} des Mibefradils für L-Typ Ca^{2+} Kanäle, die 12-fach geringer ist als die IC_{50} für L-Typ Ca^{2+} Kanäle. In der Literatur wird dieser Wert jedoch kontrovers

diskutiert. Während die Gruppe um Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2006) überhaupt keine Selektivität des Mibefradils feststellen konnte, beschreibt die Mehrzahl der Studien eine 10- bis 30-fach höhere Affinität für T-Typ Ca^{2+} Kanäle (Martin *et al.*, 2000, Mishra und Hermsmeyer, 1994, Perchenet *et al.*, 2000). Da aufgrund dieser kontroversen Studienlage keine eindeutige Aussage über die Selektivität des Mibefradils getroffen werden kann, ist es möglich, dass die hier verwendete Konzentration von 2 μM auch zu einer partiellen Inhibition von L-Typ Ca^{2+} Kanälen führte. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden wurden die Experimente daher mit dem hochselektiven T-Typ Ca^{2+} Kanal Blocker Z944 wiederholt. Z944 inhibiert alle drei Cav3 Isoformen mit IC_{50} Werten im submicromolaren Bereich (Tringham *et al.*, 2012).

4.2.4 Physiologische Relevanz der L- und T-Typ Ca^{2+} Kanäle in LC Neuronen

In einer jüngeren Studie wurde gezeigt, dass Cav1 vermittelte, „low-voltage“ aktivierte Ca^{2+} Ströme in LC Neuronen zeitgleich zu den intrinsisch generierten APs auftreten, jedoch keinen direkten Einfluss auf die Feuerrate haben (Sanchez-Padilla *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit wird dieses Ergebnis unterstützt, da die Applikation geringer Isradipin Konzentrationen die AP-Frequenz der LC Neurone nicht beeinflusste (vgl. Abbildung 3.9). Auch die alleinige Inhibition von T-Typ Ca^{2+} Kanälen führte zu keiner Veränderung der Schrittmacherfrequenz. Dies führt zu der Frage, welche physiologische Funktion dem ausgeprägten „low-voltage“ aktivierten Ca^{2+} Strom in LC Neuronen zukommt. Eine generell akzeptierte Funktion von T-Typ Ca^{2+} Kanälen in zentralen Neuronen mit hyperpolarisiertem Membranpotenzial ist die Generierung von *low threshold spikes*, den Auslösern von *AP bursts* (Lambert *et al.*, 2014). Auch LC Neurone zeigen *in vivo* neben der tonischen Schrittmacheraktivität phasische (*burst*) Entladungsmuster (Rajkowski *et al.*, 2004). Um die Rolle der T-Typ Ca^{2+} Kanäle bei der Initiation des *burst* Entladungsmusters zu untersuchen, muss es jedoch Modelle geben, die dieses Aktivitätsmusters *in vitro* simulieren. Innerhalb der vorliegenden Arbeit war es nur in seltenen Fällen durch gleichzeitige Injektionen negativer Ströme und Applikation von Glutamat möglich ein solches Entladungsmuster hervorzurufen und mit Mibefradil zu antagonisieren (nicht gezeigt). Da diese Beobachtung jedoch nicht reproduzierbar genug war um weitere Studien zu rechtfertigen, kann derzeit über eine Rolle der T-Typ Ca^{2+} Kanäle bei der *burst* Aktivität von LC Neuronen nur spekuliert werden. Wie in der Einleitung beschrieben, geben jüngere Studien Hinweise darauf, dass T-Typ Ca^{2+} Kanäle jedoch nicht nur bei der Initiation von *burst* Aktivitäten eine Rolle spielen, sondern auch direkt tonische Entladungen, die von depolarisierteren Membranpotenzialen ausgehen, beeinflussen können. Da T-Typ Ca^{2+} Kanäle bei zunehmender Depolarisation des Membranpotenzials rasch inaktivieren, ist dies jedoch nur bei ausreichender Kanal-Dichte möglich. So führt eine hohe Dichte an Cav3 Kanälen in Neuronen des Thalamus dazu, dass ein genügend großer Anteil dieser Kanäle auch bei depolarisiertem

Membranpotenzial verfügbar ist und einen direkten Einfluss auf die tonische Entladungsrate der Neurone hat (Deleuze *et al.*, 2012; Lambert *et al.*, 2014). Dieses Kriterium scheint auch in LC Neuronen erfüllt zu sein, da die RT-PCR Experimente innerhalb der vorliegenden Arbeit die Expression aller drei Cav3 Familienmitglieder zeigte (vgl. Abbildung 3.6). Des Weiteren beschreibt die Gruppe um Wolfart und Roeper, dass T-Typ Ca^{2+} Kanäle die Schrittmacherfrequenz dopaminergener Neurone der SNpc regulieren, indem sie an K_{Ca} Kanäle koppeln (Wolfart und Roeper, 2002). In der Literatur wird eine solche Kopplung von sowohl T-Typ als auch L-Typ Ca^{2+} Kanälen an K_{Ca} Kanäle auch in diversen weiteren Zelltypen beschrieben (Berkefeld *et al.*, 2006, Marrion und Tavalin, 1998). Dieser Mechanismus könnte auch für die in der vorliegenden Studie beobachtete Veränderung der Feuerrate nach simultaner Blockade von L-Typ und T-Typ Ca^{2+} Kanälen verantwortlich sein (vgl. Abbildung 3.9 und 3.10). Die alleinige Blockade einer der „low-voltage“ aktivierten Ca^{2+} Stromkomponenten würde demnach nicht ausreichen um die Aktivierung von K_{Ca} Kanälen zu verhindern. Bei gleichzeitiger Inhibition von Cav1 und Cav3 Kanälen könnte es jedoch zu einer verminderten K_{Ca} Kanal Aktivierung und daraus resultierend zu einer verringerten NHP Amplitude und einer beschleunigten AP-Frequenz kommen. Es kann postuliert werden, dass T-Typ Ca^{2+} Kanäle in LC Neuronen je nach Aufmerksamkeits-Status des Organismus unterschiedliche Funktionen übernehmen. Wobei sie während Phasen tonischer Aktivität im Zusammenspiel mit L-Typ Ca^{2+} Kanälen zum Erhalt des stabilen Schrittmachermechanismus coeruleärer Neurone beitragen.

4.3 Die Modulation der Schrittmacheraktivität von LC Neuronen durch SK Kanäle und ihre neuroprotektive Bedeutung

Trotz der bedeutenden Funktion der Ca^{2+} aktivierten Kaliumkanäle für die Regulation der elektrischen Aktivität vieler zentraler Neurone war die molekulare Identität und physiologische Funktion dieser Kanäle in murinen LC Neuronen bislang unbekannt. Im Gegensatz dazu existieren zahlreiche Studien, die SK Kanälen eine frequenzmodulierende Rolle in dopaminergen Neuronen der SNpc zuschreiben (Wolfart *et al.*, 2001, Wolfart und Roeper, 2002, Deignan *et al.*, 2012). Des Weiteren wurden die physiologischen Veränderungen von SNpc Neuronen in verschiedenen *in vitro* PD Modellen, darunter das Modell der Rotenon-Toxizität, ausführlich beschrieben (Dolga *et al.*, 2014, Xiong *et al.*, 2012). Die Wirkung einer Roten-Exposition auf LC Neurone und ob die Manipulation von SK Kanälen in diesem Modell protektiv sein kann, wurde hingegen bislang nicht untersucht. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können folgende Schlüsse gezogen werden: Erstens, LC Neurone exprimieren funktionelle SK Kanäle, die maßgeblich für die während der NHP fließenden Ströme dieser Neurone verantwortlich sind. Zweitens, SK Kanäle wirken als Regulatoren der Schrittmacherfrequenz von LC Neuronen. Drittens, die pharmakologische SK Kanal Aktivierung verhindert die Dysregulation der Ca^{2+}

Homöostase, die Depolarisation und Frequenzsteigerung und schließlich die Degeneration von LC Neuronen im *in vitro* Rotenon-Toxizitätsmodell. Daher wird postuliert, dass die Aktivierung von SK Kanälen ein vielversprechender Ansatzpunkt zur therapeutischen Neuroprotektion des LC darstellen könnte.

4.3.2 Funktionelle SK Kanäle formen den I_{NHP} muriner LC Neurone

Eine Rolle Apamin-sensitiver Ströme in LC Neuronen der Ratte wurde erstmals in den 1990er Jahren postuliert (Osmanović *et al.*, 1990, Osmanović und Shefner, 1993)). In diesen elektrophysiologischen Studien im Hirnschnittpräparat wurde dokumentiert, dass Apamin eine Komponente der Nachhyperpolarisation inhibiert und eine Frequenzsteigerung der APs, die als Folge positiver Strominjektionen auftreten, bedingt. Später beschrieben Murai *et al.* die Aktivierung von K_{Ca} Kanälen während ischämischer Bedingungen in dissoziierten LC Neuronen der Ratte (Murai *et al.*, 1997). Die biophysikalischen Eigenschaften dieser Ca^{2+} aktivierten K^+ Ströme wurden jedoch weder von Osmanović *et al.* noch von Murai *et al.* beschrieben. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde mittels eines hybriden Spannungsprotokolls gezeigt, dass LC Neurone der Maus Apamin-sensitive Ströme aufweisen, die eine schnelle, innerhalb von etwa 200 ms abklingende Stromkomponente des I_{NHP} (sI_{NHP}) ausmachen, die langsame Komponente des I_{NHP} (lI_{NHP}) jedoch nicht beeinflussen (vgl. Abbildung 3.12). Dies ist konsistent zu den Eigenschaften SK Kanal vermittelter Ströme in Neuronen der SNpc und des DMV. In diesen Neuronen wurde beschrieben, dass der durch SK Kanäle vermittelte Strom maßgeblich für eine schnell abklingende Stromkomponente mit Zeitkonstanten von 100-200 ms verantwortlich ist, nicht aber für die langsam abklingende Komponente (Sah, 1996, Wolfart *et al.*, 2001). Bei Analyse der APs in der *Current-Clamp* Konfiguration spiegelt sich dieser Apamin-Effekt auch in der Reduktion der NHP Amplitude wieder (vgl. Abbildung 3.14). Die Nachhyperpolarisation der APs zentraler Neurone wird generell in eine schnelle, eine mittlere und eine langsame Komponente unterteilt, wobei Letztere jedoch vornehmlich nach AP *bursts* auftritt (Sah und Faber, 2002). Zahlreiche Studien dokumentieren, dass die schnelle Komponente, die schon während des APs aktiviert und nur wenige Millisekunden anhält, primär durch die Aktivierung von BK Kanälen entsteht (Lancaster und Nicoll, 1987, Shao *et al.*, 1999). Die mittlere Komponente der NHP tritt innerhalb von 5 ms nach dem AP auf und klingt innerhalb mehrerer hundert Millisekunden wieder ab (Sah und Faber, 2002). In dopaminergen Neuronen der SNpc und weiteren Neuronen des ZNS ist diese NHP Komponente Apamin-sensitiv und wird demnach durch die Aktivierung von SK Kanälen vermittelt (Sah und McLachlan, 1991, Wolfart *et al.*, 2001). Innerhalb der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass auch die NHP muriner LC Neurone maßgeblich von Apamin-sensitiven Strömen gestaltet wird und ist somit konsistent zu den Ergebnissen, die Osmanovic *et al.* für LC Neuronen der Ratte beschreiben (Osmanović *et al.*, 1990). Überraschend war,

dass die *Current-Clamp* Messungen keine klare Unterscheidung zwischen einer schnellen und mittleren NHP Komponente zuließen (vgl. Abbildung 3.14 A), obwohl mittels der RT-PCR Experimente Transkripte der BK Kanal Untereinheit detektiert wurden (vgl. Abbildung 3.11). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Aktivierung von BK Kanälen noch vor der Deaktivierung anderer an der Repolarisation beteiligter Kv Kanäle stattfindet und deshalb nicht aufgelöst werden konnte.

Die individuellen biophysikalischen Eigenschaften des I_{NHP} unterschiedlicher Neurone hängen stark von der jeweiligen Untereinheiten Komposition der SK Kanäle ab (Sah und Faber, 2002, Stocker und Pedarzani, 2000). Mittels der RT-PCR Experimente in Abbildung 3.11 wurden in murinen LC Neuronen Transkripte der SK Kanal Untereinheiten SK1, SK2 und SK3 nachgewiesen. In zwei breiten immunohistochemischen Studien sowohl des Gehirns der Maus als auch der Ratte wurde im LC eine starke Immunreaktivität für SK2 und SK3 detektiert, nicht aber für SK1 (Sailer *et al.*, 2004, Stocker und Pedarzani, 2000). Obwohl die innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführte RT-PCR Methode keine Aussage über die Quantität der jeweiligen Transkripte zulässt, kann im Kontext der Studien von Sailer *et al.* und Stocker *et al.* postuliert werden, dass vor allem SK2 und SK3 Untereinheiten funktionell in LC Neuronen von Bedeutung sein könnten. Da bei der in den elektrophysiologischen Experimenten eingesetzten Apamin-Konzentration von 200 nM alle SK Kanal Untereinheit blockiert werden (Lamy *et al.*, 2010), kann anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht geklärt werden, welche Zusammensetzung dieser Untereinheiten primär die I_{NHP} der LC Neurone vermittelt. Hierzu wären weiterführende Studien mit selektiveren Inhibitoren oder transgenen (*knock-out*) Mäusen notwendig.

4.3.3 SK Kanäle wirken als Schrittmacher-Modulatoren der LC Neurone

Innerhalb des vergangenen Jahrzehnts ist eine Vielzahl an Studien erschienen, die den Einfluss der SK Kanäle auf das Aktivitätsmuster zentraler Neurone beleuchten. So wurde gezeigt, dass SK2 Kanäle die Spontanaktivität zerebellärer Purkinje-Zellen und von Neuronen des Nucleus Subthalamicus regulieren (Stocker *et al.*, 2004). SK3 Kanäle wurden hingegen als Modulatoren der Frequenz von Neuronen des DMV und der SNpc beschrieben (Pedarzani *et al.*, 2000, Wolfart und Roeper, 2002). Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, zeigen Osmanović *et al.*, dass die Apamin-Applikation in LC Neuronen der Ratte zu einer Frequenzsteigerung der APs nach Injektion positiver Ströme führt. Eine Apamin-induzierte Veränderung der Frequenz spontan generierter APs konnte in den *Whole-Cell* Messungen dieser Studie hingegen nur bei etwa einem Drittel der gemessenen Neurone festgestellt werden (Osmanović *et al.*, 1990). Auch innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte bei Messungen in der *Whole-Cell* Konfiguration keine signifikante Veränderung der Feuerrate spontanaktiver muriner LC Neurone durch Apamin festgestellt werden (nicht gezeigt). Bedeutenderweise kam es jedoch bei Messungen in der *Perforated-Patch* Konfiguration zu einer drastischen Apamin-induzierten Beschleunigung der Feuerrate in allen

gemessenen LC Neuronen (vgl. Abbildung 3.13). Dies deutet daraufhin, dass die Funktion der SK Kanäle in LC Neuronen streng vom intrazellulären Milieu abhängig ist. So könnte eine Manipulation der Ca^{2+} Puffer-Kapazität, wie sie im Rahmen der *Whole-Cell* Messungen geschieht, zu einer veränderten Aktivierbarkeit der SK Kanäle führen und die Wirkung des Apamins überdecken. Dass die intrinsische Feuerrate muriner LC Neurone von SK Kanälen reguliert wird, wurde auch durch die Experimente mit dem positiven SK Kanal Modulator NS309 bestätigt. Im Gegensatz zur beschleunigten Feurrate durch Inhibition der SK Kanäle führte deren Aktivierung zu einer Verlangsamung der Schrittmacherfrequenz (vgl. Abbildung 3.15). Ebenfalls in Konsistenz zu den Auswirkungen des Apamins führte die NS309 Applikation zu einer Vergrößerung der NHP Amplitude, welche am wahrscheinlichsten für das verzögerte Auftreten der APs verantwortlich ist (vgl. Abbildung 3.15 F und G). Auffallend war, dass der NS309 Effekt sowohl konzentrationsabhängig als auch zeitabhängig war. Bei Erhöhung der NS309 Konzentration von 1 μM auf 20 μM kam es neben einer drastischeren Frequenzverlangsamung und Vergrößerung der NHP Amplitude außerdem zu einer Verschiebung des Membranpotenzials hin zu negativeren Werten (vgl. Abbildung 3.15 E). NS309 aktiviert alle Untereinheiten der SK Kanäle mit einer EC_{50} von 10 nM (Strøbaek *et al.*, 2004). Da die effektive Konzentration einer Substanz innerhalb des Hirnschnittes jedoch wesentlich geringer ausfällt als diejenige in der Badlösung ist wahrscheinlich, dass 1 μM NS309 in diesem Versuchsaufbau zur Aktivierung aller SK Kanäle nicht ausreichten. Die Verwendung einer hohen NS309 Konzentration von 20 μM birgt jedoch die Gefahr unspezifischer Effekte durch die Beeinflussung anderer Ionenkanalfamilien. In heterologen Expressionssystemen wurde gezeigt, dass NS309 auch in hohen Konzentrationen keine Wirkung auf BK Kanäle, Kv Kanäle, Cav Kanäle und TTX sensitive Na^+ Kanäle hat. Kanäle der hERG Familie werden jedoch durch NS309 Konzentrationen im micromolaren Bereich blockiert (Strøbaek *et al.*, 2004). Da der NS309 vermittelte Effekt jedoch durch Applikation von Apamin antagonisiert wurde (vgl. Abbildung 3.16), kann davon ausgegangen werden, dass dieser tatsächlich durch die Aktivierung von SK Kanälen und nicht durch unspezifische Effekte vermittelt wurde.

In einer elektrophysiologischen Studie dopaminerger Neurone der SNpc konnte neben der Rolle von SK3 Kanälen bei der Frequenzregulation gezeigt werden, dass SK2 Kanäle die Regelmäßigkeit des Schrittmachers bestimmen (Deignan *et al.*, 2012). Da SK2 und SK3 Kanal Untereinheiten auch in LC Neuronen exprimiert sind (vgl. Abbildung 3.11), könnte ihnen diese Rolle hier ebenfalls zukommen. Während die Analyse des Variationskoeffizienten der ISI Verteilungen nach Inhibition der SK Kanäle keine Unterschiede zu Kontrolle ergab, wurden die intrinsischen APs nach Aktivierung der SK Kanäle mit hohen NS309 Konzentrationen unregelmäßiger (vgl. Abbildung 3.13 D und 3.15 D). Dass SK Kanäle unter physiologischen Bedingungen die Präzision des Schrittmachermechanismus coeruleärer Neurone modulieren ist demnach unwahrscheinlich. Es kann jedoch postuliert werden, dass sich eine vermehrte

Rekrutierung dieser Kanäle, zum Beispiel unter Bedingungen erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} Level, nicht nur auf die AP-Frequenz, sondern auch auf die AP-Regelmäßigkeit auswirkt.

4.3.4 Neuroprotektiver Effekt der pharmakologischen SK Kanal Aktivierung

Die Dysregulation der Ca^{2+} Homöostase durch die vermehrte Rekrutierung glutamaterger NMDA-Rezeptoren ist seit langem als Pathogenitätsfaktor während der Entstehung der PD anerkannt (Beal, 1998). Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine zu hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zentraler Neurone die Fehlfunktion unterschiedlichster metabolischer Prozesse bedingt und schließlich zum Zelltod führt (Lipton und Nicotera, 1998). Im Hinblick auf die PD wären demnach pharmakologische Mechanismen wünschenswert, die diesen Prozess der Exzitotoxizität aufhalten können.

Während das Modell der Exzitotoxizität zelluläre Zustände simuliert, die zu einem relativ späten Zeitpunkt der PD Pathogenese auftreten und schnell in den Zelltod münden, simuliert das Rotenon-Modell auch Teile der frühen, während der PD Pathogenese auftretenden, zellulären Veränderungen. Eine wachsende Anzahl an Studien demonstriert, dass die Exposition mit Pestiziden das Risiko an PD zu erkranken drastisch erhöht (Tanner *et al.*, 2009, Kamel *et al.*, 2007, Petrovitch *et al.*, 2002). Um zukünftige Therapie-Strategien entwickeln zu können ist daher von großer Bedeutung zu verstehen, welche pathophysiologischen Veränderungen Pestizide in vulnerablen Hirnregionen wie dem LC verursachen und wie pharmakologisch in diesen Prozess eingegriffen werden könnte.

4.3.4.1 Normalisierung der Ca^{2+} Homöostase im Glutamat Exzitotoxizitätsmodell

Mittels pharmakologischer und immunhistochemischer Studien wurden sowohl ionotrope (NMDA, AMPA, Kainat), als auch metabotrope Glutamatrezeptoren in Neuronen des LC nachgewiesen (Jodo und Aston-Jones 1997; Noriega *et al.*, 2007). In Konsistenz dazu wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Exposition dissoziierter LC Neurone mit hohen Glutamat Konzentrationen zu einem drastischen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führte (vgl. Abbildung 3.17).

SK Kanäle befinden sich in Neuronen des ZNS meist in räumlicher Nähe zu glutamatergen NMDA-Rezeptoren und können so dem exzitatorischen postsynaptischen Potenzial entgegenwirken (Dolga und Culmsee, 2012). In kortikalen Neuronen der Ratte wurde gezeigt, dass die pharmakologische Aktivierung von SK Kanälen dem NMDA-vermittelten Ca^{2+} Influx und der damit verbundenen Exzitotoxizität entgegenwirken kann (Dolga *et al.*, 2011). In Abbildung 3.17 der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass die Aktivierung von SK Kanälen mittels NS309 auch in Neuronen des LC einer Glutamat-induzierten Ca^{2+} Überladung der Zellen entgegenwirkte, die Inhibition von SK Kanälen mittels Apamin diese jedoch drastisch verstärkte. Es kann demnach postuliert werden, dass SK Kanäle auch in

LC Neuronen in Assoziation mit NMDA-Rezeptoren vorliegen und als Regulatoren des Glutamatbedingten Ca^{2+} Influx fungieren.

In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass SK Kanäle nicht nur in der Plasmamembran neuronaler Zellen, sondern auch in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind (Dolga *et al.*, 2013). Es könnte demnach sein, dass der innerhalb der vorliegenden Arbeit beobachtete NS309 Effekt über mitochondriale SK Kanäle vermittelt wird. Da die simultane Vorinkubation mit Apamin, welches nicht in die Zelle diffundieren und so die mitochondriale Membran erreichen kann, den NS309 Effekt vollständig aufhob (vgl. Abbildung 3.17 E und F), kann dies jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden.

Unter physiologischen Bedingungen sind NMDA-Rezeptoren durch extrazelluläres Mg^{2+} blockiert. Um in den leitfähigen Zustand zu gelangen muss zunächst eine Vordepolarisation des Membranpotenzials, meist über die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren, erfolgen. Die Generierung regelmäßiger intrinsischer APs führt in LC Neuronen dazu, dass sich das Membranpotenzial stets in einem relativ depolarisierten Bereich befindet (vgl. Tabelle 3.1). Da der Mg^{2+} Block der NMDA Rezeptoren in diesem Spannungsbereich ineffektiv wird, könnten auch geringe Glutamat Konzentrationen zur Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und auf längere Sicht zu einem erhöhten Level an oxidativem Stress führen. In diesem Kontext könnte die pharmakologische Aktivierung membranständiger SK Kanäle dazu beitragen die LC Neurone vor toxischen Ca^{2+} Konzentrationen zu schützen und eine normale Ca^{2+} Homöostase aufrechtzuerhalten.

4.3.4.2 Verhinderung der Rotenon-induzierten Neurodegeneration

Die Inhibition des mitochondrialen Komplex I der Atmungskette durch Rotenon reproduziert im Tiermodell sowohl das Auftreten vieler PD ähnlicher klinischer Symptome als auch die Bildung von Lewy-Körperchen als histopathologisches Korrelat der PD. In Hirnschnittpräparaten der SNpc verursacht Rotenon eine zeitabhängige progressive Degeneration der dopaminergen Neurone (Xiong *et al.*, 2012).

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde mittels der in Abschnitt 2.4.4 beschriebenen stereologischen Methode eine Gesamtzahl von 2500 TH-immunoreaktiven LC Neuronen ermittelt (vgl. Abbildung 3.23). Dieser Wert ist konsistent zu einer früheren Studie, in welcher ein vergleichbares stereologisches Verfahren angewendet wurde (O'Neil *et al.*, 2007). Im vergangenen Jahrzehnt wurde beschrieben, dass eine Rotenon-Exposition nicht nur in dissoziierten SNpc Neuronen, sondern auch in noradrenergen Neuronen des LC das Auftreten PD ähnlicher pathologischer Veränderungen hervorruft (Chaves *et al.*, 2010, Höglinger *et al.*, 2003). Erstmalig wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass eine Rotenon-Exposition akuter Hirnschnitte schon nach wenigen Stunden zu einem signifikanten Zellverlust

noradrenerger Neurone des LC führte (vgl. Abbildung 3.22 und 3.23). Bedeutenderweise konnte diesem Zellverlust durch pharmakologische Aktivierung von SK Kanälen entgegengewirkt werden (vgl. Abbildung 3.22 und 3.23). Eine neuroprotektive Wirkung der SK Kanal Aktivierung wird in einer wachsenden Anzahl an Studien postuliert. So verhindert die SK Kanal Aktivierung mit NS309 den Verlust kultivierter, humaner, dopaminerger Neurone im Modell der Rotenon-Toxizität (Dolga *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu führt die negative pharmakologische Modulation von SK Kanälen mit der Substanz NS8593 (Strøbaek *et al.*, 2006) zu einer Reduktion der Zellzahl dopaminerger SNpc Neurone der Ratte (Benítez *et al.*, 2011).

Verschiedene Ansätze kommen in Frage, um zu erklären, auf welche Weise die Aktivierung von SK Kanälen im Kontext der Rotenon-Toxizität neuroprotektiv sein könnte. Zunächst wurde in Abbildung 3.18 gezeigt, dass die Applikation von 1 μ M Rotenon zu einem drastischen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ coeruleärer Neurone führte und dass eine Vorinkubation mit NS309 diese Ca^{2+} Überladung verhinderte (vgl. Abbildung 3.18). In ihrer Studie an kultivierten, humanen, dopaminergen Neuronen beschreiben Dolga *et al.* ebenfalls eine Reduktion des Rotenon-induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ bei Vorinkubation mit NS309 (Dolga *et al.*, 2014). Im vorherigen Abschnitt wurde bereits aufgezeigt, dass chronisch erhöhte Ca^{2+} Level molekulare Signalkaskaden aktivieren und so den apoptotischen Zelltod initiieren. In Konsistenz mit den Ergebnissen der Glutamat Exzitotoxizität kann demnach postuliert werden, dass ein neuroprotektiver Wirkmechanismus der SK Kanal Aktivierung die Normalisierung der Ca^{2+} Homöostase unter toxischen Bedingungen ist.

Ein weiterer Mechanismus der Rotenon-Toxizität kann Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften der LC Neurone betreffen. So würde im Modell des aktivitätsabhängigen oxidativen Stresses eine chronisch erhöhte Feuerrate zu massiven zellulären Schäden führen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen daraufhin, dass schon eine kurzfristige Rotenon-Exposition die physiologischen Eigenschaften von LC Neuronen auf zwei Arten beeinflusst: i) durch die Depolarisation des Membranpotenzials, welche bei der Hälfte der Neurone bis zur vollständigen Einstellung der Spontanaktivität – vermutlich durch Inaktivierung von Nav Kanälen- reicht und ii) durch die Verkleinerung der NHP, welche eine beschleunigte AP-Frequenz bedingt (vgl. Abbildung 3.19). Diese Effekte sind wahrscheinlich durch eine Rotenon-bedingte funktionelle Einschränkung von SK Kanälen zu erklären, da nach zweistündiger Exposition eine drastische Reduktion des I_{NHP} auftrat (vgl. Abbildung 3.20). Bedeutenderweise antagonisierte die simultane Inkubation mit NS309 sowohl die Rotenon-induzierten Effekte auf das Feuerverhalten als auch auf den I_{NHP} der LC Neurone (vgl. Abbildung 3.19 und 3.20).

Wie bereits im Abschnitt 3.4.3.3 erwähnt, wurde in einem transgenen Mausmodell gezeigt, dass die α -Synuklein Überexpression zu einer beschleunigten Feuerrate durch oxidative Modulation des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv4.3 führt (Subramaniam *et al.*, 2014). Neben Kv4.3 vermitteln

auch Kv1 Untereinheiten in Kombination mit Kv β 1 bei Depolarisation des Membranpotenzials einen I_{to} , der durch das oxidative Potenzial der Zelle reguliert wird (Decher *et al.*, 2008, Snyders, 1999, Wang *et al.*, 1996). Die innerhalb der vorliegenden Arbeit detektierte Expression dieser Kaliumkanal Untereinheiten sowie die tendenzielle Reduktion des I_{to} nach Rotenon-Exposition (vgl. Abbildung 3.21) weisen daraufhin, dass die Wirkung des Neurotoxins Rotenon auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von LC Neuronen wahrscheinlich auf die indirekte Modulation mehrerer Ionenkanal-Untereinheiten zurückzuführen ist. Die Beeinflussung des SK Kanal vermittelten K⁺ Effluxes scheint hierbei jedoch von herausragender Rolle zu sein.

Anhand der hier präsentierten Daten kann nicht abschließend beurteilt werden, inwieweit der neuroprotektive Effekt des NS309 neben der Aktivierung plasmamembranständiger SK Kanäle auch über die Aktivierung mitochondrialer SK Kanäle vermittelt wird. Dolga *et al.* dokumentieren, dass die Aktivierung mitochondrialer SK2 Kanäle im Modell der Rotenon-Toxizität in humanen dopaminergen Neuronen vor mitochondrialer Dysfunktion und gesteigerten ATP-Leveln schützt (Dolga *et al.*, 2014). Anders als im Falle der Glutamat-Toxizität kam es in der vorliegenden Studie auch bei simultaner Vorinkubation mit NS309 und Apamin zu einer tendenziellen Reduktion der Rotenon-bedingten Ca²⁺ Überladung coeruleärer Neurone (vgl. Abbildung 3.18). Dies weist daraufhin, dass der protektive Effekt des NS309 in LC Neuronen zwar primär über die Aktivierung plasmamembranständiger SK Kanäle vermittelt wird, eine Rolle mitochondrialer SK Kanäle aber ebenfalls wahrscheinlich ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die durch Rotenon bedingte Dysregulation der Ca²⁺ Homöostase, das pathologisch veränderte Aktivitätsmuster sowie der Zelltod von LC Neuronen durch Aktivierung von SK Kanälen verhindert werden kann. Es wird daher postuliert, dass die pharmakologische Aktivierung von SK Kanälen als Therapie-Strategie dienen könnte, um den Zellverlust noradrenerger LC Neurone während der PD Pathogenese zu verhindern und das Fortschreiten der Erkrankung in einem frühen Stadium aufzuhalten.

4.4 Ausblick

Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Expressionsprofil kann als Grundlage für weitere elektrophysiologische Untersuchungen des komplexen Schrittmachermechanismus von LC Neuronen dienen. Interessante Kandidaten sind in diesem Zusammenhang vor allem die A-Typ K^+ Kanäle Kv4.3 und die Kv1 Familie mit Kv β 1. Eine Beeinträchtigung dieser Kanäle durch ein erhöhtes oxidatives Potential pathologisch veränderter Zellen könnte, wie in der SNpc (Subramaniam *et al.*, 2014), auch im LC zu der gesteigerten AP-Frequenz und einer dadurch bedingten zytotoxischen Ca^{2+} Überladung der Zelle beitragen. Diese Hypothese könnte mittels weiterführender Patch-Clamp Untersuchungen im Modell der Rotenon-Toxizität und/oder in anderen *in vitro* PD Modellen überprüft werden. Des Weiteren kann das Expressionsprofil der K_2P Kanäle als Anhaltspunkt zur Untersuchung der Wirkungsweise von Pharmaka, wie den Inhalationsanästhetika, dienen. Der von Sirois *et al.* postulierte Wirkmechanismus des Inhalationsanästhetikums Halothan über die Aktivierung von TASK-1 Kanälen (Sirois *et al.*, 2000) oder ob auch TREK-1 Kanäle an diesem Mechanismus beteiligt sind, könnte mittels elektrophysiologischer Untersuchungen mit selektiven K_2P Kanal Inhibitoren im LC überprüft werden. Die funktionelle Charakterisierung der L- und T-Typ Ca^{2+} Kanäle lässt die Vermutung zu, dass das Zusammenspiel dieser Kanäle den Schrittmachermechanismus der LC Neurone über Kopplung an SK Kanäle reguliert. In dopaminergen Neuronen der SNpc erfolgt diese Kopplung selektiv über T-Typ Ca^{2+} Kanäle (Wolfart und Roeper, 2002). Ein interessanter Ansatz um einen solchen Zusammenhang in LC Neuronen aufzulösen wäre die Analyse des I_{NHP} unter selektiver pharmakologischer Inhibition einzelner Cav Kanal Familienmitglieder.

Eine erhöhte Schrittmacherfrequenz führt sowohl in Neuronen des DMV und der SNpc als auch in denen des LC durch Cav1 vermittelten Ca^{2+} Influx zu mitochondrialem oxidativem Stress (Goldberg *et al.*, 2012; Guzman *et al.*, 2010; Sanchez-Padilla *et al.*, 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werfen die Frage auf, ob neben Cav1 Kanälen auch Cav3 Kanäle an der Auslösung von aktivitätsabhängigem oxidativem Stress im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sein könnten. Ein Indiz dafür, dass die Modulation von T-Typ Ca^{2+} Kanälen ein vielversprechender Ansatz zur Entwicklung neuer Therapie-Strategien der PD sein könnte, liefert das im Jahre 2009 in Japan als Anti-PD Medikament anerkannte Zonisamid, welches unter anderem inhibierend auf T-Typ Ca^{2+} Kanäle wirkt (Murata, 2010). Ob der neuroprotektive Mechanismus dieses Medikaments jedoch tatsächlich auf der Modulation der T-Typ Ca^{2+} Kanäle beruht, ist bislang unklar. Ein tieferes Verständnis der Rolle von T-Typ Ca^{2+} Kanälen im LC und anderen, während der PD Pathogenese betroffenen, Hirnregionen ist demnach wünschenswert. Ein erster Ansatz könnte diesbezüglich in der Analyse der putativ neuroprotektiven Wirkung selektiver T-Typ Ca^{2+} Kanal Inhibitoren in *in vitro* PD Modellen sein.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann postuliert werden, dass SK Kanäle weitreichende regulatorische Funktionen auf die elektrische Aktivität von LC Neuronen ausüben. Obwohl die Inhibition der SK Kanäle in LC Neuronen, anders als in SNpc Neuronen (Deignan *et al.*, 2012), zwar die Frequenz, nicht aber die Präzision des Schrittmachers beeinflusst, kann davon ausgegangen werden, dass die verschiedenen SK Kanal Familienmitglieder auch in LC Neuronen individuelle Aufgaben erfüllen. Dolga *et al.* Dokumentieren, dass eine chronische Rotenon-Exposition kultivierter dopaminergischer Neurone selektiv zu einem Funktionsverlust plasmamembranständiger und mitochondrialer SK2 Kanäle führt (Dolga *et al.*, 2014). Es wäre daher erstrebenswert mittels quantitativer PCR Experimente der Frage nachzugehen, welche SK Kanal Subtypen vorrangig in LC Neuronen exprimiert sind und ob sich die Expressions-Level nach Rotenon-Exposition verschieben. Zur weiteren Analyse der Funktion einzelner SK Kanal Familienmitglieder unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen könnten anschließend elektrophysiologische Untersuchungen des LC mit subtyp-spezifischen *knock-out* Mäusen (Deignan *et al.*, 2012) erfolgen.

Um den neuroprotektiven Mechanismus der SK Kanal Aktivierung weiter aufzuschlüsseln, wäre es interessant neben den in dieser Arbeit beleuchteten Effekten des NS309 auf plasmamembranständige SK Kanäle auch potentielle mitochondriale Effekte zu beleuchten. Zu diesem Zweck könnte beispielsweise die Veränderung der ROS-Produktion der Mitochondrien dopaminergischer Neurone nach Rotenon-Exposition oder/und SK Kanal Aktivierung durch Experimente mit dem fluorogenen Farbstoff MitoSOX (Dagda *et al.*, 2009) beleuchtet werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abernethy, D. R. & Soldatov, N. M. 2002. Structure-functional diversity of human L-type Ca^{2+} channel: perspectives for new pharmacological targets. *J Pharmacol Exp Ther*, **300**, 724-8.
- Alam, Z. I., Daniel, S. E., Lees, A. J., Marsden, D. C., Jenner, P. & Halliwell, B. 1997. A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem*, **69**, 1326-9.
- Alberio, T., Lopiano, L. & Fasano, M. 2012. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS J*, **279**, 1146-55.
- Allen Institute for Brain & Science 2015. Allen Mouse Brain Atlas [Internet]. Available from: <http://mouse.brain-map.org>).
- Alreja, M. & Aghajanian, G. K. 1991. Pacemaker activity of locus coeruleus neurons: whole-cell recordings in brain slices show dependence on cAMP and protein kinase A. *Brain Res*, **556**, 339-43.
- Andersen, J. K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*, **10 Suppl**, S18-25.
- Arima, K. & Akashi, T. 1990. Involvement of the locus coeruleus in Pick's disease with or without Pick body formation. *Acta Neuropathol*, **79**, 629-33.
- Aston-Jones, G. & Cohen, J. D. 2005. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci*, **28**, 403-50.
- Aston-Jones, G., Shipley, M. T., Chouvet, G., Ennis, M., van Bockstaele, E., Pieribone, V., Shiekhata, R., Akaoka, H., Drolet, G. & Astier, B. 1991. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res*, **88**, 47-75.
- Aston-Jones, G., Zhu, Y. & Card, J. P. 2004. Numerous GABAergic afferents to locus coeruleus in the pericellular dendritic zone: possible interneuronal pool. *J Neurosci*, **24**, 2313-21.
- Baker, K. G., Törk, I., Hornung, J. P. & Halasz, P. 1989. The human locus coeruleus complex: an immunohistochemical and three dimensional reconstruction study. *Exp Brain Res*, **77**, 257-70.
- Ballantyne, D., Andrzejewski, M., Mückenhoff, K. & Scheid, P. 2004. Rhythms, synchrony and electrical coupling in the Locus coeruleus. *Respir Physiol Neurobiol*, **143**, 199-214.
- Beal, M. F. 1998. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol*, **44**, S110-4.
- Bean, B. P. 1984. Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 6388-92.
- Bean, B. P. 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 451-65.

- Becker, A. J., Pitsch, J., Sochivko, D., Opitz, T., Staniek, M., Chen, C. C., Campbell, K. P., Schoch, S., Yaari, Y. & Beck, H. 2008. Transcriptional upregulation of Cav3.2 mediates epileptogenesis in the pilocarpine model of epilepsy. *J Neurosci*, **28**, 13341-53.
- Bekar, L. K., He, W. & Nedergaard, M. 2008. Locus coeruleus alpha-adrenergic-mediated activation of cortical astrocytes in vivo. *Cereb Cortex*, **18**, 2789-95.
- Benarroch, E. E. 2009. The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology*, **73**, 1699-704.
- Benítez, B. A., Belálcazar, H. M., Anastasia, A., Mamah, D. T., Zorumski, C. F., Mascó, D. H., Herrera, D. G. & de Erausquin, G. A. 2011. Functional reduction of SK3-mediated currents precedes AMPA-receptor-mediated excitotoxicity in dopaminergic neurons. *Neuropharmacology*, **60**, 1176-86.
- Berkefeld, H., Fakler, B. & Schulte, U. 2010. Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev*, **90**, 1437-59.
- Berkefeld, H., Sailer, C. A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J. O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D., Knaus, H. G., Schulte, U. & Fakler, B. 2006. BK_{Ca}-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science*, **314**, 615-20.
- Berridge, C. W. & Waterhouse, B. D. 2003. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev*, **42**, 33-84.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V. & Greenamyre, J. T. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, **3**, 1301-6.
- Bing, G., Zhang, Y., Watanabe, Y., McEwen, B. S. & Stone, E. A. 1994. Locus coeruleus lesions potentiate neurotoxic effects of MPTP in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Brain Res*, **668**, 261-5.
- Birnbaumer, L., Campbell, K. P., Catterall, W. A., Harpold, M. M., Hofmann, F., Horne, W. A., Mori, Y., Schwartz, A., Snutch, T. P. & Tanabe, T. 1994. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **13**, 505-6.
- Bloom, F. E. 1979. Chemically coded transmitter systems. *Prog Brain Res*, **51**, 125-31.
- Braak, H. & Del Tredici, K. 2010. [Pathophysiology of sporadic Parkinson's disease]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, **78 Suppl 1**, S2-4.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N. & Braak, E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, **24**, 197-211.
- Broicher, T., Kanyshkova, T., Landgraf, P., Rankovic, V., Meuth, P., Meuth, S. G., Pape, H. C. & Budde, T. 2007. Specific expression of low-voltage-activated calcium channel isoforms and splice variants in thalamic local circuit interneurons. *Mol Cell Neurosci*, **36**, 132-45.
- Bruening-Wright, A., Lee, W. S., Adelman, J. P. & Maylie, J. 2007. Evidence for a deep pore activation gate in small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Gen Physiol*, **130**, 601-10.

- Cain, S. M. & Snutch, T. P. 2010. Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing. *Channels (Austin)*, **4**, 475-82.
- Catterall, W. A., Striessnig, J., Snutch, T. P., Perez-Reyes, E. & Pharmacology, I. U. o. 2003. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev*, **55**, 579-81.
- Chan, C. S., Guzman, J. N., Ilijic, E., Mercer, J. N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G. E. & Surmeier, D. J. 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature*, **447**, 1081-6.
- Chaves, R. S., Melo, T. Q., Martins, S. A. & Ferrari, M. F. 2010. Protein aggregation containing β -amyloid, α -synuclein and hyperphosphorylated τ in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. *BMC Neurosci*, **11**, 144.
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Bourinet, E., Nargeot, J. & Lory, P. 2002. Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms (α 1G), α 1H and α 1I) to neuronal excitability. *J Physiol*, **540**, 3-14.
- Chieng, B. & Bekkers, J. M. 1999. GABA_B, opioid and α 2 receptor inhibition of calcium channels in acutely-dissociated locus coeruleus neurones. *Br J Pharmacol*, **127**, 1533-8.
- Collingridge, G. L., James, T. A. & MacLeod, N. K. 1979. Neurochemical and electrophysiological evidence for a projection from the locus coeruleus to the substantia nigra [proceedings]. *J Physiol*, **290**, 44P.
- Cribbs, L. L., Lee, J. H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M. & Perez-Reyes, E. 1998. Cloning and characterization of α 1H from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ Res*, **83**, 103-9.
- D'Adamo, M. C., Shang, L., Imbrici, P., Brown, S. D., Pessia, M. & Tucker, S. J. 2011. Genetic inactivation of Kcnj16 identifies Kir5.1 as an important determinant of neuronal PCO_2/pH sensitivity. *J Biol Chem*, **286**, 192-8.
- Dagda, R. K., Cherra, S. J., Kulich, S. M., Tandon, A., Park, D. & Chu, C. T. 2009. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem*, **284**, 13843-55.
- de Lau, L. M. & Breteler, M. M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, **5**, 525-35.
- de Oliveira, R. B., Howlett, M. C., Gravina, F. S., Imtiaz, M. S., Callister, R. J., Brichta, A. M. & van Helden, D. F. 2010. Pacemaker currents in mouse locus coeruleus neurons. *Neuroscience*, **170**, 166-77.
- Decher, N., Gonzalez, T., Streit, A. K., Sachse, F. B., Renigunta, V., Soom, M., Heinemann, S. H., Daut, J. & Sanguinetti, M. C. 2008. Structural determinants of Kv β 1.3-induced channel inactivation: a hairpin modulated by PIP2. *EMBO J*, **27**, 3164-74.
- Deignan, J., Luján, R., Bond, C., Riegel, A., Watanabe, M., Williams, J. T., Maylie, J. & Adelman, J. P. 2012. SK2 and SK3 expression differentially affect firing frequency and precision in dopamine neurons. *Neuroscience*, **217**, 67-76.

- Deleuze, C., David, F., Béhuret, S., Sadoc, G., Shin, H. S., Uebele, V. N., Renger, J. J., Lambert, R. C., Leresche, N. & Bal, T. 2012. T-type calcium channels consolidate tonic action potential output of thalamic neurons to neocortex. *J Neurosci*, **32**, 12228-36.
- Destexhe, A., Neubig, M., Ulrich, D. & Huguenard, J. 1998. Dendritic low-threshold calcium currents in thalamic relay cells. *J Neurosci*, **18**, 3574-88.
- Dolga, A. M. & Culmsee, C. 2012. Protective Roles for Potassium SK/K_{(Ca)2} Channels in Microglia and Neurons. *Front Pharmacol*, **3**, 196.
- Dolga, A. M., de Andrade, A., Meissner, L., Knaus, H. G., Höllerhage, M., Christophersen, P., Zischka, H., Plesnila, N., Höglinger, G. U. & Culmsee, C. 2014. Subcellular expression and neuroprotective effects of SK channels in human dopaminergic neurons. *Cell Death Dis*, **5**, e999.
- Dolga, A. M., Netter, M. F., Perocchi, F., Doti, N., Meissner, L., Tobaben, S., Grohm, J., Zischka, H., Plesnila, N., Decher, N. & Culmsee, C. 2013. Mitochondrial small conductance SK2 channels prevent glutamate-induced oxytosis and mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem*, **288**, 10792-804.
- Dolga, A. M., Terpolilli, N., Kepura, F., Nijholt, I. M., Knaus, H. G., D'Orsi, B., Prehn, J. H., Eisel, U. L., Plant, T., Plesnila, N. & Culmsee, C. 2011. K_{Ca2} channels activation prevents [Ca²⁺]_i deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia. *Cell Death Dis*, **2**, e147.
- Elbaz, A. & Tranchant, C. 2007. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, **262**, 37-44.
- Ennis, M. & Aston-Jones, G. 1989. GABA-mediated inhibition of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla. *J Neurosci*, **9**, 2973-81.
- Epstein, B. J., Vogel, K. & Palmer, B. F. 2007. Dihydropyridine calcium channel antagonists in the management of hypertension. *Drugs*, **67**, 1309-27.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W. & Catterall, W. A. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **25**, 533-5.
- Espay, A. J., LeWitt, P. A. & Kaufmann, H. 2014. Norepinephrine deficiency in Parkinson's disease: the case for noradrenergic enhancement. *Mov Disord*, **29**, 1710-9.
- Faber, E. S., Delaney, A. J. & Sah, P. 2005. SK channels regulate excitatory synaptic transmission and plasticity in the lateral amygdala. *Nat Neurosci*, **8**, 635-41.
- Fakler, B. & Adelman, J. P. 2008. Control of K_(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron*, **59**, 873-81.
- Filosa, J. A. & Putnam, R. W. 2003a. Multiple targets of chemosensitive signaling in locus coeruleus neurons: role of K⁺ and Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, **284**, C145-55.
- Filosa, J. A. & Putnam, R. W. 2003b. Multiple targets of chemosensitive signaling in locus coeruleus neurons: role of K⁺ and Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, **284**, C145-55.
- Flucher, B. E. & Franzini-Armstrong, C. 1996. Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8101-6.

- Foote, S. L., Aston-Jones, G. & Bloom, F. E. 1980. Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 3033-7.
- Foote, S. L., Bloom, F. E. & Aston-Jones, G. 1983. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev*, **63**, 844-914.
- Fornai, F., Bassi, L., Torracca, M. T., Scalori, V. & Corsini, G. U. 1995. Norepinephrine loss exacerbates methamphetamine-induced striatal dopamine depletion in mice. *Eur J Pharmacol*, **283**, 99-102.
- Forsythe, I. D., Linsdell, P. & Stanfield, P. R. 1992. Unitary A-currents of rat locus coeruleus neurones grown in cell culture: rectification caused by internal Mg^{2+} and Na^+ . *J Physiol*, **451**, 553-83.
- Freestone, P. S., Chung, K. K., Guatteo, E., Mercuri, N. B., Nicholson, L. F. & Lipski, J. 2009. Acute action of rotenone on nigral dopaminergic neurons--involvement of reactive oxygen species and disruption of Ca^{2+} homeostasis. *Eur J Neurosci*, **30**, 1849-59.
- Fuller, P. M., Saper, C. B. & Lu, J. 2007. The pontine REM switch: past and present. *J Physiol*, **584**, 735-41.
- German, D. C., Manaye, K. F., White, C. L., Woodward, D. J., McIntire, D. D., Smith, W. K., Kalaria, R. N. & Mann, D. M. 1992. Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Ann Neurol*, **32**, 667-76.
- Gesi, M., Soldani, P., Giorgi, F. S., Santinami, A., Bonaccorsi, I. & Fornai, F. 2000. The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*, **24**, 655-68.
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. 2000. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, **290**, 985-9.
- Goldberg, J. A., Guzman, J. N., Estep, C. M., Ilijic, E., Kondapalli, J., Sanchez-Padilla, J. & Surmeier, D. J. 2012. Calcium entry induces mitochondrial oxidant stress in vagal neurons at risk in Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, **15**, 1414-21.
- Gomora, J. C., Enyeart, J. A. & Enyeart, J. J. 1999. Mibefradil potently blocks ATP-activated K^+ channels in adrenal cells. *Mol Pharmacol*, **56**, 1192-7.
- Gompf, H. S., Mathai, C., Fuller, P. M., Wood, D. A., Pedersen, N. P., Saper, C. B. & Lu, J. 2010. Locus ceruleus and anterior cingulate cortex sustain wakefulness in a novel environment. *J Neurosci*, **30**, 14543-51.
- Gray, A. T., Zhao, B. B., Kindler, C. H., Winegar, B. D., Mazurek, M. J., Xu, J., Chavez, R. A., Forsayeth, J. R. & Yost, C. S. 2000. Volatile anesthetics activate the human tandem pore domain baseline K^+ channel KCNK5. *Anesthesiology*, **92**, 1722-30.
- Greif, K. F., Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J. & Tobin, A. J. 1991. Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum. *Neurochem Res*, **16**, 235-42.
- Grenhoff, J., Nisell, M., Ferré, S., Aston-Jones, G. & Svensson, T. H. 1993. Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J Neural Transm Gen Sect*, **93**, 11-25.

- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W. & Wang, X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, **57**, 473-508.
- Guzman, J. N., Sánchez-Padilla, J., Chan, C. S. & Surmeier, D. J. 2009. Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurosci*, **29**, 11011-9.
- Hagiwara, S., Ozawa, S. & Sand, O. 1975. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol*, **65**, 617-44.
- Harik, S. I. & McGunigal, T. 1984. The protective influence of the locus ceruleus on the blood-brain barrier. *Ann Neurol*, **15**, 568-74.
- Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. 1992. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science*, **258**, 1152-5.
- Heneka, M. T., Ramanathan, M., Jacobs, A. H., Dumitrescu-Ozimek, L., Bilkei-Gorzo, A., Debeir, T., Sastre, M., Galldiks, N., Zimmer, A., Hoehn, M., Heiss, W. D., Klockgether, T. & Staufenbiel, M. 2006. Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci*, **26**, 1343-54.
- Hetzenauer, A., Sinnegger-Brauns, M. J., Striessnig, J. & Singewald, N. 2006. Brain activation pattern induced by stimulation of L-type Ca²⁺-channels: contribution of Cav1.3 and Cav1.2 isoforms. *Neuroscience*, **139**, 1005-15.
- Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, USA, Sinauer Associates.
- Hockerman, G. H., Peterson, B. Z., Sharp, E., Tanada, T. N., Scheuer, T. & Catterall, W. A. 1997. Construction of a high-affinity receptor site for dihydropyridine agonists and antagonists by single amino acid substitutions in a non-L-type Ca²⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14906-11.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N. & Aldrich, R. W. 1991. Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region.) *Neuron*. United States.
- Hougaard, C., Eriksen, B. L., Jørgensen, S., Johansen, T. H., Dyhring, T., Madsen, L. S., Strøbaek, D. & Christophersen, P. 2007. Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Br J Pharmacol*, **151**, 655-65.
- Huang, X. & Jan, L. Y. 2014. Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol*, **206**, 151-62.
- Huang, Z., Lujan, R., Kadurin, I., Uebele, V. N., Renger, J. J., Dolphin, A. C. & Shah, M. M. 2011. Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat Neurosci*, **14**, 478-86.
- Höglinger, G. U., Féger, J., Prigent, A., Michel, P. P., Parain, K., Champy, P., Ruberg, M., Oertel, W. H. & Hirsch, E. C. 2003. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem*, **84**, 491-502.
- Imber, A. N. & Putnam, R. W. 2012. Postnatal development and activation of L-type Ca²⁺ currents in locus ceruleus neurons: implications for a role for Ca²⁺ in central chemosensitivity. *J Appl Physiol (1985)*, **112**, 1715-26.

- Inanobe, A., Yoshimoto, Y., Horio, Y., Morishige, K. I., Hibino, H., Matsumoto, S., Tokunaga, Y., Maeda, T., Hata, Y., Takai, Y. & Kurachi, Y. 1999. Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J Neurosci*, **19**, 1006-17.
- Irwin, D. J., Brettschneider, J., McMillan, C. T., Cooper, F., Olm, C., Arnold, S. E., Van Deerlin, V. M., Seeley, W. W., Miller, B. L., Lee, E. B., Lee, V. M., Grossman, M. & Trojanowski, J. Q. 2015. Deep Clinical and Neuropathological Phenotyping of Pick's Disease. *Ann Neurol*.
- Ishimatsu, M. & Williams, J. T. 1996. Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions. *J Neurosci*, **16**, 5196-204.
- Ito, H., Klugbauer, N. & Hofmann, F. 1997. Transfer of the high affinity dihydropyridine sensitivity from L-type to non-L-type calcium channel. *Mol Pharmacol*, **52**, 735-40.
- Jahnsen, H. & Llinás, R. 1984. Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study. *J Physiol*, **349**, 205-26.
- Janitzky, K., Lippert, M. T., Engelhorn, A., Tegtmeier, J., Goldschmidt, J., Heinze, H. J. & Ohl, F. W. 2015. Optogenetic silencing of locus coeruleus activity in mice impairs cognitive flexibility in an attentional set-shifting task. *Front Behav Neurosci*, **9**, 286.
- Jodo, E., Chiang, C. & Aston-Jones, G. 1998. Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neuroscience*, **83**, 63-79.
- Johnson, S. M., Haxhiu, M. A. & Richerson, G. B. 2008. GFP-expressing locus ceruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO₂/H⁺ responses in primary cell culture. *J Appl Physiol (1985)*, **105**, 1301-11.
- Jones, B. E., Halaris, A. E., McIlhenny, M. & Moore, R. Y. 1977. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res*, **127**, 1-21.
- Jones, B. E. & Yang, T. Z. 1985. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol*, **242**, 56-92.
- Kalasz, H., Watanabe, T., Yabana, H., Itagaki, K., Naito, K., Nakayama, H., Schwartz, A. & Vaghy, P. L. 1993. Identification of 1,4-dihydropyridine binding domains within the primary structure of the alpha 1 subunit of the skeletal muscle L-type calcium channel. *FEBS Lett*, **331**, 177-81.
- Kamel, F., Tanner, C., Umbach, D., Hoppin, J., Alavanja, M., Blair, A., Comyns, K., Goldman, S., Korell, M., Langston, J., Ross, G. & Sandler, D. 2007. Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. *Am J Epidemiol*, **165**, 364-74.
- Kawano, T., Zhao, P., Nakajima, S. & Nakajima, Y. 2004. Single-cell RT-PCR analysis of GIRK channels expressed in rat locus coeruleus and nucleus basalis neurons. *Neurosci Lett*, **358**, 63-7.
- Kilbourn, M. R., Sherman, P. & Abbott, L. C. 1998. Reduced MPTP neurotoxicity in striatum of the mutant mouse tottering. *Synapse*, **30**, 205-10.
- Kish, S. J., Shannak, K. S., Rajput, A. H., Gilbert, J. J. & Hornykiewicz, O. 1984. Cerebellar norepinephrine in patients with Parkinson's disease and control subjects. *Arch Neurol*, **41**, 612-4.

- Klugbauer, N., Marais, E., Lacinová, L. & Hofmann, F. 1999. A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflugers Arch*, **437**, 710-5.
- Klöckner, U., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Daud, A., Hescheler, J., Pereverzev, A., Perez-Reyes, E. & Schneider, T. 1999. Comparison of the Ca^{2+} currents induced by expression of three cloned $\alpha 1$ subunits, $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ and $\alpha 1I$, of low-voltage-activated T-type Ca^{2+} channels. *Eur J Neurosci*, **11**, 4171-8.
- Kokubun, S., Porzig, H., Prod'homme, B. & Reuter, H. 1986. The voltage-dependent effect of 1,4-dihydropyridine enantiomers on Ca channels in cardiac cells. *Jpn Heart J*, **27 Suppl 1**, 57-63.
- Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J. & Striessnig, J. 2001. $\alpha 1D$ (Cav1.3) subunits can form L-type Ca^{2+} channels activating at negative voltages. *J Biol Chem*, **276**, 22100-6.
- Kuiper, E. F., Nelemans, A., Luiten, P., Nijholt, I., Dolga, A. & Eisel, U. 2012. $\text{K}_{\text{Ca}2}$ and $\text{K}_{\text{Ca}3}$ channels in learning and memory processes, and neurodegeneration. *Front Pharmacol*, **3**, 107.
- Kurata, H. T. & Fedida, D. 2006. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol*, **92**, 185-208.
- Kyrozis, A. & Reichling, D. B. 1995. Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *J Neurosci Methods*, **57**, 27-35.
- Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J. & Adelman, J. P. 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*, **273**, 1709-14.
- Lacinová, L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys*, **24 Suppl 1**, 1-78.
- Lambert, R. C., Bessaïh, T., Crunelli, V. & Leresche, N. 2014. The many faces of T-type calcium channels. *Pflugers Arch*, **466**, 415-23.
- Lamy, C., Goodchild, S. J., Weatherall, K. L., Jane, D. E., Liégeois, J. F., Seutin, V. & Marrion, N. V. 2010. Allosteric block of KCa2 channels by apamin. *J Biol Chem*, **285**, 27067-77.
- Lancaster, B. & Nicoll, R. A. 1987. Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol*, **389**, 187-203.
- Langston, J. W. 2006. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol*, **59**, 591-6.
- Lee, J. H., Daud, A. N., Cribbs, L. L., Lacerda, A. E., Pereverzev, A., Klöckner, U., Schneider, T. & Perez-Reyes, E. 1999. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci*, **19**, 1912-21.
- Lee, T. S., Kaku, T., Takebayashi, S., Uchino, T., Miyamoto, S., Hadama, T., Perez-Reyes, E. & Ono, K. 2006. Actions of mibefradil, efonidipine and nifedipine block of recombinant T- and L-type Ca channels with distinct inhibitory mechanisms. *Pharmacology*, **78**, 11-20.
- Laurangier, V., Mangoni, M. E., Nargeot, J. & Richard, S. 2001. Inhibition of T-type and L-type calcium channels by mibefradil: physiologic and pharmacologic bases of cardiovascular effects. *J Cardiovasc Pharmacol*, **37**, 649-61.

- Lipscombe, D., Helton, T. D. & Xu, W. 2004. L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol*, **92**, 2633-41.
- Lipton, S. A. & Nicotera, P. 1998. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium*, **23**, 165-71.
- Liss, B., Franz, O., Sewing, S., Bruns, R., Neuhoﬀ, H. & Roeper, J. 2001. Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J*, **20**, 5715-24.
- Liu, J. H., Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R. & Bernheim, L. 1999. Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca^{2+} and K^{+} currents in human fusion-competent myoblasts. *Br J Pharmacol*, **126**, 245-50.
- Llinás, R. & Yarom, Y. 1981. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol*, **315**, 549-67.
- Lory, P. & Chemin, J. 2007. Towards the discovery of novel T-type calcium channel blockers. *Expert Opin Ther Targets*, **11**, 717-22.
- Magee, J. C., Christofi, G., Miyakawa, H., Christie, B., Lasser-Ross, N. & Johnston, D. 1995. Subthreshold synaptic activation of voltage-gated Ca^{2+} channels mediates a localized Ca^{2+} influx into the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, **74**, 1335-42.
- Mann, D. M. & Yates, P. O. 1983. Pathological basis for neurotransmitter changes in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **9**, 3-19.
- Marrion, N. V. & Tavalin, S. J. 1998. Selective activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels by co-localized Ca^{2+} channels in hippocampal neurons. *Nature*, **395**, 900-5.
- Martin, R. L., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E. & Hanck, D. A. 2000. Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther*, **295**, 302-8.
- Mathis, J., Hess, C. W. & Bassetti, C. 2007. Isolated mediotegmental lesion causing narcolepsy and rapid eye movement sleep behaviour disorder: a case evidencing a common pathway in narcolepsy and rapid eye movement sleep behaviour disorder. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **78**, 427-9.
- Matschke, L. A. 2011. Diplomarbeit: Charakterisierung elektrischer Leitfähigkeiten in Locus Coeruleus Neuronen der Maus.).
- Matschke, L. A., Bertoune, M., Roeper, J., Snutch, T. P., Oertel, W. H., Rinné, S. & Decher, N. 2015. A concerted action of L- and T-type Ca^{2+} channels regulates locus coeruleus pacemaking. *Mol Cell Neurosci*, **68**, 293-302.
- Mermelstein, P. G., Song, W. J., Tkatch, T., Yan, Z. & Surmeier, D. J. 1998. Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci*, **18**, 6650-61.
- Mishra, S. K. & Hermsmeyer, K. 1994. Selective inhibition of T-type Ca^{2+} channels by Ro 40-5967. *Circ Res*, **75**, 144-8.
- Mounsey, R. B. & Teismann, P. 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: pathogenesis and neuroprotection. *Parkinsons Dis*, **2011**, 617472.

- Murai, Y. & Akaike, T. 2005. Orexins cause depolarization via nonselective cationic and K⁺ channels in isolated locus coeruleus neurons. *Neurosci Res*, **51**, 55-65.
- Murai, Y., Ishibashi, H., Koyama, S. & Akaike, N. 1997. Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat locus coeruleus neurons induced by experimental ischemia, anoxia, and hypoglycemia. *J Neurophysiol*, **78**, 2674-81.
- Murata, M. 2010. Zonisamide: a new drug for Parkinson's disease. *Drugs Today (Barc)*, **46**, 251-8.
- Nagai, T., Satoh, K., Imamoto, K. & Maeda, T. 1981. Divergent projections of catecholamine neurons of the locus coeruleus as revealed by fluorescent retrograde double labeling technique. *Neurosci Lett*, **23**, 117-23.
- Nerbonne, J. M. 2000. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol*, **525 Pt 2**, 285-98.
- Nieber, K., Sevcik, J. & Illes, P. 1995. Hypoxic changes in rat locus coeruleus neurons in vitro. *J Physiol*, **486 (Pt 1)**, 33-46.
- Niepel, G., Bibani, R. H., Vilisaar, J., Langley, R. W., Bradshaw, C. M., Szabadi, E. & Constantinescu, C. S. 2013. Association of a deficit of arousal with fatigue in multiple sclerosis: effect of modafinil. *Neuropharmacology*, **64**, 380-8.
- O'Neil, J. N., Mouton, P. R., Tizabi, Y., Ottinger, M. A., Lei, D. L., Ingram, D. K. & Manaye, K. F. 2007. Catecholaminergic neuronal loss in locus coeruleus of aged female dtg APP/PS1 mice. *J Chem Neuroanat*, **34**, 102-7.
- O'Sullivan, S. S., Williams, D. R., Gallagher, D. A., Massey, L. A., Silveira-Moriyama, L. & Lees, A. J. 2008. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. *Mov Disord*, **23**, 101-6.
- Oertel, W. H. & Kupsch, A. 1993. Pathogenesis and animal studies of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol Neurosurg*, **6**, 323-32.
- Osmanović, S. S. & Shefner, S. A. 1993. Calcium-activated hyperpolarizations in rat locus coeruleus neurons in vitro. *J Physiol*, **469**, 89-109.
- Osmanović, S. S., Shefner, S. A. & Brodie, M. S. 1990. Functional significance of the apamin-sensitive conductance in rat locus coeruleus neurons. *Brain Res*, **530**, 283-9.
- Oyamada, Y., Ballantyne, D., Mückenhoff, K. & Scheid, P. 1998. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol*, **513 (Pt 2)**, 381-98.
- Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. 1987. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*, **237**, 749-53.
- Parvizi, J. & Damasio, A. R. 2003. Neuroanatomical correlates of brainstem coma. *Brain*, **126**, 1524-36.
- Patel, A. J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G. & Lazdunski, M. 1999. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci*, **2**, 422-6.

- Pavese, N., Rivero-Bosch, M., Lewis, S. J., Whone, A. L. & Brooks, D. J. 2011. Progression of monoaminergic dysfunction in Parkinson's disease: a longitudinal 18F-dopa PET study. *Neuroimage*, **56**, 1463-8.
- Pedarzani, P., Kulik, A., Muller, M., Ballanyi, K. & Stocker, M. 2000. Molecular determinants of Ca^{2+} -dependent K^+ channel function in rat dorsal vagal neurones. *J Physiol*, **527 Pt 2**, 283-90.
- Pedarzani, P. & Storm, J. F. 1993. PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K^+ current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron*, **11**, 1023-35.
- Perchenet, L., Bénardeau, A. & Ertel, E. A. 2000. Pharmacological properties of $\text{Ca}_v3.2$, a low voltage-activated Ca^{2+} channel cloned from human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **361**, 590-9.
- Perez-Reyes, E. 1998. Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, **30**, 313-8.
- Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*, **83**, 117-61.
- Perez-Reyes, E., Van Deusen, A. L. & Vitko, I. 2009. Molecular pharmacology of human $\text{Ca}_v3.2$ T-type Ca^{2+} channels: block by antihypertensives, antiarrhythmics, and their analogs. *J Pharmacol Exp Ther*, **328**, 621-7.
- Perez-Reyes, E., Wei, X. Y., Castellano, A. & Birnbaumer, L. 1990. Molecular diversity of L-type calcium channels. Evidence for alternative splicing of the transcripts of three non-allelic genes. *J Biol Chem*, **265**, 20430-6.
- Petrovitch, H., Ross, G. W., Abbott, R. D., Sanderson, W. T., Sharp, D. S., Tanner, C. M., Masaki, K. H., Blanchette, P. L., Popper, J. S., Foley, D., Launer, L. & White, L. R. 2002. Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. *Arch Neurol*, **59**, 1787-92.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O. & White, L. E. 2008. *Neuroscience*, USA, Sinauer Associates.
- Puschmann, A., Bhidayasiri, R. & Weiner, W. J. 2012. Synucleinopathies from bench to bedside. *Parkinsonism Relat Disord*, **18 Suppl 1**, S24-7.
- Rajkowski, J., Majczynski, H., Clayton, E. & Aston-Jones, G. 2004. Activation of monkey locus coeruleus neurons varies with difficulty and performance in a target detection task. *J Neurophysiol*, **92**, 361-71.
- Rettig, J., Heinemann, S. H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D. N., Dolly, J. O. & Pongs, O. 1994. Inactivation properties of voltage-gated K^+ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*, **369**, 289-94.
- Roeper, J., Sewing, S., Zhang, Y., Sommer, T., Wanner, S. G. & Pongs, O. 1998. NIP domain prevents N-type inactivation in voltage-gated potassium channels. *Nature*, **391**, 390-3.
- Rommelfanger, K. S. & Weinshenker, D. 2007. Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*, **74**, 177-90.

- Ruppersberg, J. P., Frank, R., Pongs, O. & Stocker, M. 1991. Cloned neuronal IK_A channels reopen during recovery from inactivation. *Nature*, **353**, 657-60.
- Sah, P. 1996. Ca^{2+} -activated K^+ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci*, **19**, 150-4.
- Sah, P. & Faber, E. S. 2002. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol*, **66**, 345-53.
- Sah, P. & McLachlan, E. M. 1991. Ca^{2+} -activated K^+ currents underlying the afterhyperpolarization in guinea pig vagal neurons: a role for Ca^{2+} -activated Ca^{2+} release. *Neuron*, **7**, 257-64.
- Sailer, C. A., Kaufmann, W. A., Marksteiner, J. & Knaus, H. G. 2004. Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance Ca^{2+} -activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Mol Cell Neurosci*, **26**, 458-69.
- Sakmann, B. & Neher, E. 1984. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol*, **46**, 455-72.
- Sanchez-Padilla, J., Guzman, J. N., Ilijic, E., Kondapalli, J., Galtieri, D. J., Yang, B., Schieber, S., Oertel, W., Wokosin, D., Schumacker, P. T. & Surmeier, D. J. 2014. Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nat Neurosci*, **17**, 832-40.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L. & Keating, M. T. 1996. Coassembly of K_VLQT1 and $minK$ (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature*, **384**, 80-3.
- Sara, S. J. 2009. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 211-23.
- Schmitz, C. & Hof, P. R. 2005. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, **130**, 813-31.
- Schneider, T., Regulla, S. & Hofmann, F. 1991. The devapamil-binding site of the purified skeletal muscle receptor for organic-calcium channel blockers is modulated by micromolar and millimolar concentrations of Ca^{2+} . *Eur J Biochem*, **200**, 245-53.
- Scholze, A., Plant, T. D., Dolphin, A. C. & Nurnberg, B. 2001. Functional expression and characterization of a voltage-gated $Ca_v1.3$ ($\alpha 1D$) calcium channel subunit from an insulin-secreting cell line. *Mol Endocrinol*, **15**, 1211-21.
- Schwarz, L. A. & Luo, L. 2015. Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. *Curr Biol*, **25**, R1051-6.
- Selikhova, M., Williams, D. R., Kempster, P. A., Holton, J. L., Revesz, T. & Lees, A. J. 2009. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain*, **132**, 2947-57.
- Shannak, K., Rajput, A., Rozdilsky, B., Kish, S., Gilbert, J. & Hornykiewicz, O. 1994. Noradrenaline, dopamine and serotonin levels and metabolism in the human hypothalamus: observations in Parkinson's disease and normal subjects. *Brain Res*, **639**, 33-41.
- Shao, L. R., Halvorsrud, R., Borg-Graham, L. & Storm, J. F. 1999. The role of BK-type Ca^{2+} -dependent K^+ channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*, **521 Pt 1**, 135-46.

- Sharma, Y., Xu, T., Graf, W. M., Fobbs, A., Sherwood, C. C., Hof, P. R., Allman, J. M. & Manaye, K. F. 2010. Comparative anatomy of the locus coeruleus in humans and nonhuman primates. *J Comp Neurol*, **518**, 963-71.
- Shipe, W. D., Barrow, J. C., Yang, Z. Q., Lindsley, C. W., Yang, F. V., Schlegel, K. A., Shu, Y., Rittle, K. E., Bock, M. G., Hartman, G. D., Tang, C., Ballard, J. E., Kuo, Y., Adarayan, E. D., Prueksaritanont, T., Zrada, M. M., *et al.* 2008. Design, synthesis, and evaluation of a novel 4-aminomethyl-4-fluoropiperidine as a T-type Ca^{2+} channel antagonist. *J Med Chem*, **51**, 3692-5.
- Sirois, J. E., Lei, Q., Talley, E. M., Lynch, C. & Bayliss, D. A. 2000. The TASK-1 two-pore domain K^+ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci*, **20**, 6347-54.
- Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W. & Feldman, J. L. 1991. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, **254**, 726-9.
- Snyders, D. J. 1999. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*, **42**, 377-90.
- Stocker, M., Hirzel, K., D'hoedt, D. & Pedarzani, P. 2004. Matching molecules to function: neuronal Ca^{2+} -activated K^+ channels and afterhyperpolarizations. *Toxicon*, **43**, 933-49.
- Stocker, M. & Pedarzani, P. 2000. Differential distribution of three Ca^{2+} -activated K^+ channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci*, **15**, 476-93.
- Storm, J. F. 1989. An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*, **409**, 171-90.
- Striessnig, J., Koschak, A., Sinnegger-Brauns, M. J., Hetzenauer, A., Nguyen, N. K., Busquet, P., Pelster, G. & Singewald, N. 2006. Role of voltage-gated L-type Ca^{2+} channel isoforms for brain function. *Biochem Soc Trans*, **34**, 903-9.
- Strøbaek, D., Hougaard, C., Johansen, T. H., Sørensen, U. S., Nielsen, E., Nielsen, K. S., Taylor, R. D., Pedarzani, P. & Christophersen, P. 2006. Inhibitory gating modulation of small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels by the synthetic compound I-N-(benzimidazol-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine (NS8593) reduces afterhyperpolarizing current in hippocampal CA1 neurons. *Mol Pharmacol*, **70**, 1771-82.
- Strøbaek, D., Teuber, L., Jørgensen, T. D., Ahring, P. K., Kjaer, K., Hansen, R. S., Olesen, S. P., Christophersen, P. & Skaaning-Jensen, B. 2004. Activation of human IK and SK Ca^{2+} -activated K^+ channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime). *Biochim Biophys Acta*, **1665**, 1-5.
- Subramaniam, M., Althof, D., Gispert, S., Schwenk, J., Auburger, G., Kulik, A., Fakler, B. & Roeper, J. 2014. Mutant α -synuclein enhances firing frequencies in dopamine substantia nigra neurons by oxidative impairment of A-type potassium channels. *J Neurosci*, **34**, 13586-99.
- Surmeier, D. J., Guzman, J. N., Sanchez-Padilla, J. & Goldberg, J. A. 2011. The origins of oxidant stress in Parkinson's disease and therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal*, **14**, 1289-301.
- Szabadi, E. 2013. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *J Psychopharmacol*, **27**, 659-93.

- Takahashi, K., Kayama, Y., Lin, J. S. & Sakai, K. 2010. Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience*, **169**, 1115-26.
- Tanner, C. M., Ross, G. W., Jewell, S. A., Hauser, R. A., Jankovic, J., Factor, S. A., Bressman, S., Deligtisch, A., Marras, C., Lyons, K. E., Bhudhikanok, G. S., Roucoux, D. F., Meng, C., Abbott, R. D. & Langston, J. W. 2009. Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. *Arch Neurol*, **66**, 1106-13.
- Tringham, E., Powell, K. L., Cain, S. M., Kuplast, K., Mezeyova, J., Weerapura, M., Eduljee, C., Jiang, X., Smith, P., Morrison, J. L., Jones, N. C., Braine, E., Rind, G., Fee-Maki, M., Parker, D., Pajouhesh, H., *et al.* 2012. T-type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures. *Sci Transl Med*, **4**, 121ra19.
- Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D., Bley, K. & Fox, A. 1995. Reflections on Ca²⁺-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci*, **18**, 52-4.
- Usher, M., Cohen, J. D., Servan-Schreiber, D., Rajkowski, J. & Aston-Jones, G. 1999. The role of locus coeruleus in the regulation of cognitive performance. *Science*, **283**, 549-54.
- Valentino, R. J. & Van Bockstaele, E. 2008. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol*, **583**, 194-203.
- van den Pol, A. N., Ghosh, P. K., Liu, R. J., Li, Y., Aghajanian, G. K. & Gao, X. B. 2002. Hypocretin (orexin) enhances neuron activity and cell synchrony in developing mouse GFP-expressing locus coeruleus. *J Physiol*, **541**, 169-85.
- Wang, Z., Kiehn, J., Yang, Q., Brown, A. M. & Wible, B. A. 1996. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kvbeta1 subunits. *J Biol Chem*, **271**, 28311-7.
- Waterhouse, B. D., Devilbiss, D., Fleischer, D., Sessler, F. M. & Simpson, K. L. 1998. New perspectives on the functional organization and postsynaptic influences of the locus ceruleus efferent projection system. *Adv Pharmacol*, **42**, 749-54.
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S. & Wulff, H. 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*, **57**, 463-72.
- West, M. J., Ostergaard, K., Andreassen, O. A. & Finsen, B. 1996. Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: an in situ hybridization study using the optical fractionator method. *J Comp Neurol*, **370**, 11-22.
- Williams, J. T., North, R. A., Shefner, S. A., Nishi, S. & Egan, T. M. 1984. Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience*, **13**, 137-56.
- Wolfart, J., Neuhoff, H., Franz, O. & Roeper, J. 2001. Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci*, **21**, 3443-56.
- Wolfart, J. & Roeper, J. 2002. Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci*, **22**, 3404-13.
- Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C. T., Lutsenko, S., Maylie, J. & Adelman, J. P. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, **395**, 503-7.

- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Ghoorah, D., Kong, X., Lin, Z. & Wang, T. 2012. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit Rev Toxicol*, **42**, 613-32.
- Xu, W. & Lipscombe, D. 2001. Neuronal $\text{Ca}_v1.3\alpha(1)$ L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci*, **21**, 5944-51.
- Yi, B. A., Minor, D. L., Lin, Y. F., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. 2001. Controlling potassium channel activities: Interplay between the membrane and intracellular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11016-23.
- Zhang, X., Cui, N., Wu, Z., Su, J., Tadepalli, J. S., Sekizar, S. & Jiang, C. 2010. Intrinsic membrane properties of locus coeruleus neurons in Mecp2-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, **298**, C635-46.

6. ANHÄNGE

6.1 Abkürzungssverzeichnis

ACSF	Engl.: " <u>a</u> rtificial <u>c</u> erebrospinal <u>f</u> luid"
ADHS	<u>A</u> ufmerksamkeits <u>d</u> efizit/ <u>H</u> yperaktivitäts <u>s</u> törung
AK	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
AMPA	Engl.: " <u>a</u> lpha-amino-3-hydroxy-5- <u>m</u> ethyl-4-isoxazole <u>p</u> ropionic <u>a</u> cid"
AP	<u>A</u> ktionspotenzial
AP-5	Engl.: " <u>a</u> mino- <u>5</u> - <u>p</u> hosphonovaleric acid"
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
Aqua dest.	Doppelt destilliertes Wasser
BLAST	Engl.: " <u>b</u> asic <u>l</u> ocal <u>a</u> lignment <u>s</u> earch <u>t</u> ool"
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
CaM	<u>C</u> almodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav Kanal	spannungsgesteuerter Calciumkanal
CK2	<u>C</u> asein <u>K</u> inase <u>2</u>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CV	Engl.: " <u>c</u> oefficient of <u>v</u> ariation"
DAB	<u>D</u> iaminobenzidin
Dbh	<u>D</u> opamin- <u>β</u> - <u>H</u> ydroxylase
DHP	<u>D</u> i <u>h</u> ydro <u>p</u> yridin
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DMV	<u>D</u> orsaler <u>m</u> otorischer Nucleus des Nervus <u>V</u> agus
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl: " <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid")
dNTP	Engl.: " <u>d</u> eoxy <u>n</u> ucleotide <u>t</u> riphosphate"

for	Engl.: " <i>forward</i> "
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure (engl.: " <i><u>gamma-aminobutyric acid</u></i> ")
GAD	Engl.: " <i>glutamic <u>a</u>cid <u>d</u>ecarboxylase</i> "
GAPDH	<u>G</u> lycerinal <u>d</u> ehyd-3- <u>P</u> hosphat- <u>D</u> e <u>h</u> ydrogenase
GIRK Kanal	Engl.: " <i><u>G</u>-protein <u>c</u>oupled <u>i</u>nwardly <u>r</u>ectifying <u>K</u>⁺</i> " Kanal
HERG	Engl.: " <i><u>h</u>uman <u>e</u>ther <u>a</u> <u>g</u>ogo <u>r</u>elated <u>g</u>ene</i> "
HVA	Engl.: " <i><u>h</u>igh <u>v</u>oltage-<u>a</u>ctivated</i> "
IC ₅₀	Konzentration zur 50 %-igen Inhibition
ISI	Engl.: " <i><u>I</u>nters<u>p</u>ike <u>I</u>nterval</i> "
K _{Ca} Kanal	Ca ²⁺ aktivierter Kaliumkanal
K _{ir} Kanal	Einwärtsrektifizierender Kaliumkanal
K ₂ P Kanal	Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanal
Kv Kanal	spannungsgesteuerter Kaliumkanal
LC	<u>L</u> ocus <u>C</u> oeruleus
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
Lsg.	Lösung
LTS	Engl.: " <i><u>l</u>ow <u>t</u>hreshold <u>s</u>pikes</i> "
LVA	Engl.: " <i><u>l</u>ow <u>v</u>oltage-<u>a</u>ctivated</i> "
minK	Engl.: " <i><u>m</u>inimal <u>K</u>⁺-channel protein</i> "
MPTP	1- <u>m</u> ethyl-4- <u>p</u> henyl-1,2,3,6- <u>t</u> etrahydropyridin
mRNA	Engl.: " <i><u>m</u>essenger-<u>R</u><u>N</u><u>A</u></i> "
NA	<u>N</u> or <u>a</u> drenalin
NBQX	Engl.: " <i><u>2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzoquinoxaline-2,3-dione</u></i> "
Nav Kanal	spannungsgesteuerter Natriumkanal
NHP	<u>N</u> ach <u>h</u> yperpolarisation
NMDA	Engl.: " <i><u>N</u>-<u>M</u>ethyl-<u>D</u>-<u>a</u>spartate</i> "

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: " <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction")
PD	Parkinson-Krankheit (engl.: " <u>P</u> arkinson's <u>D</u> isease")
PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> orma <u>l</u> dehyd
PP2A	<u>P</u> rotein <u>p</u> hosphatase <u>2</u> A
RBD	Engl.: " <u>R</u> EM sleep <u>b</u> ehavior <u>d</u> isorder"
REM	Engl.: " <u>R</u> apid <u>E</u> ye <u>M</u> ovement"
rev	Engl.: "reverse"
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: " <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid")
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskription
SNpc	<u>S</u> ubstantia <u>N</u> igra <u>p</u> ars <u>c</u> ompacta
TEA	<u>T</u> etra <u>e</u> thyl <u>a</u> mmonium
TH	<u>T</u> yrosin <u>h</u> ydroxylase
TTX	<u>T</u> etro <u>d</u> otoxin
UV	<u>U</u> ltraviolett
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent) (engl.: "weight/volume")
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervens <u>s</u> ystem

Nicht aufgeführt sind:

- Die Formelzeichen des Internationalen Einheitensystems (SI, Le Système international d'unités) und deren abgeleitete Einheiten.
- Die Abkürzungen für chemische Elemente. Sie entsprechen den Angaben des Periodensystems der Elemente nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).
- Allgemein gebräuchliche Abkürzungen der deutschen Sprache nach dem Duden.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abbildung 1.1:	Organisation des Locus Coeruleus- Noradrenalin Systems.	12
Abbildung 1.2:	Synthese des Neurotransmitters Noradrenalin.	13
Abbildung 1.3:	Phylogenetische Einteilung der Cav Kanäle.	18
Abbildung 1.4:	Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsschwellenwerte von Cav1.2 und Cav1.3 Kanälen.	19
Abbildung 1.5:	LC Neurone zeigen eine Ca^{2+} Leitfähigkeit mit niedrigem Aktivierungsschwellenwert.	23
Abbildung 1.6:	Vereinfachte Systematik der vier Hauptfamilien der Kaliumselektiven Ionenkanäle.	24
Abbildung 1.7:	Verwandtschaftsbeziehung der K_{Ca} - und Aufbau der SK Kanäle.	28
Abbildung 1.8:	Stadien der PD Pathogenese nach Braak.	30
Abbildung 2.1:	Konfigurationen der Patch-Clamp Technik.	47
Abbildung 2.2:	Zählkriterien zur Bestimmung der Anzahl TH-immunoreaktiver Neurone.	53
Abbildung 3.1:	Identifikation der LC-Region im Hirnschnittpräparat anhand der Tyrosinhydroxylase-Immunoreaktivität.	55
Abbildung 3.2:	LC Neurone sind autonome Schrittmacher.	56
Abbildung 3.3:	Markergen-Expression als Nachweis eines kontaminationsfreien LC Neuronen-“Pools“.	57
Abbildung 3.4:	Expressionsprofil spannungsgesteuerter Kaliumkanäle in LC Neuronen.	59
Abbildung 3.5:	Expressionsprofil der GIRK Kanal und K_2P Kanal Untereinheiten in LC Neuronen.	59
Abbildung 3.6:	LC Neurone exprimieren Cav1, Cav2 und Cav3 Ca^{2+} Kanal Untereinheiten.	61
Abbildung 3.7:	Pharmakologische Isolation L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelter Ströme.	61

Abbildung 3.8:	Pharmakologische Isolation L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal vermittelter Stromkomponenten.	63
Abbildung 3.9:	Die simultane Blockade von L- und T-Typ Ca^{2+} Kanälen bedingt eine erhöhte AP-Frequenz.	65
Abbildung 3.10:	Die kombinierte L- und T-Typ Ca^{2+} Kanal Blockade verändert auch das Feuerverhalten älterer LC Neurone.	66
Abbildung 3.11:	LC Neurone exprimieren SK und BK Kanal Untereinheiten.	67
Abbildung 3.12:	Pharmakologische Isolation SK-Kanal vermittelter Komponenten des I_{NHP} coeurulärer Neurone.	69
Abbildung 3.13:	SK Kanäle regulieren die Schrittmacher-Frequenz spontanaktiver LC Neurone.	71
Abbildung 3.14:	Apamin erhöht die Schrittmacher-Frequenz über die Modulation der Nachhyperpolarisation.	72
Abbildung 3.15:	Die Aktivierung von SK Kanälen durch NS309 verlangsamt konzentrationsabhängig die Frequenz spontanaktiver LC Neurone.	73
Abbildung 3.16:	Die SK Kanal Aktivierung mit NS309 ist zeitabhängig und wird durch Apamin antagonisiert.	75
Abbildung 3.17:	NS309 verhindert konzentrationsabhängig den Glutamat induzierten Ca^{2+} Influx primärer LC Neurone.	77
Abbildung 3.18:	NS309 antagonisiert die Rotenon induzierte Ca^{2+} Überladung primärer LC Neurone.	79
Abbildung 3.19:	NS309 antagonisiert die Rotenon induzierte Depolarisation und Frequenzsteigerung von LC Neuronen im akuten Hirnschnittpräparat.	80
Abbildung 3.20	Rotenon reduziert den SK Kanal vermittelten K^+ Efflux.	81
Abbildung 3.21	Die Rotenon Exposition reduziert den I_{to} .	82
Abbildung 3.22	Die SK Kanal Aktivierung mit NS309 schützt vor Rotenon bedingtem Zellverlust des LC.	84
Abbildung 3.23	Die SK Kanal Aktivierung mit NS309 schützt vor Rotenon bedingtem Zellverlust des LC.	84

6.3 Eigene Publikationen

Folgende Veröffentlichungen enthalten Teile der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse:

Matschke, L. A., Bertoune, M., Roeper, J., Snutch, T. P., Oertel, W. H., Rinné, S. & Decher, N. 2015. A concerted action of L- and T-type Ca^{2+} channels regulates locus coeruleus pacemaking. *Mol Cell Neurosci*, **68**, 293-302.

Weitere eigene Veröffentlichungen:

Streit, A. K. *, **Matschke, L. A. ***, Dolga, A. M., Rinné, S. & Decher, N. 2014. RNA editing in the central cavity as a mechanism to regulate surface expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.1. *J Biol Chem*, **289**, 26762-71.

* Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen

6.4 Liste der akademischen Lehrer

Philipps-Universität Marburg:

Agarwal, Adamkiewicz, Bastians, Bauer, Bertoune, Bette, Brehm, Bremmer, Daut, Decher, Del Rey, Elsässer, Feuser, Gebhard, Hasilik, Hassel, Hofmann, Huber, Jakob, Koolmann, Krebber, Lill, Lillig, Maisner, Moll, Müller, Müller-Brüsselbach, Neumüller, Oliver, Plant, Preissig-Müller, Röhm, Schäfer, Schütz, Seitz, Stiewe, Suske, Weihe, Westermann, Wrocklage, Yu

6.6 Danksagung

Als erstes bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Niels Decher, der mir diese Promotion ermöglicht hat. Ich danke ihm dafür, dass er mich stets gefordert, gefördert und motiviert hat, für seine ansteckende Begeisterungsfähigkeit und für die Hilfe bei Fragen jeglicher Art. Außerdem danke ich ihm für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Amalia Dolga aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie in Marburg für die tolle Zusammenarbeit und für ihre Anleitung und Unterstützung bei der Isolation primärer LC Neurone und bei den Calcium Imaging Experimenten.

Bei Dr. Wei-Hua Chiu und Martin Henrich aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Oertel, Klinik für Neurologie in Marburg, bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der stereologischen Analysen.

Ein großer Dank gilt zudem meinen Kollegen aus dem Institut für Physiologie in Marburg:

Dr. Susanne Rinné danke ich für die kompetente Hilfe und die guten Ratschläge bei allen molekularbiologischen Fragen. Außerdem danke ich ihr für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Aytug Kiper bedanke ich mich für seine ständige Hilfsbereitschaft bei allen EDV Problemen, für sein genaues Auge beim Beurteilen von Abbildungen und seine stets konstruktiven Vorschläge. Auch ihm möchte ich außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Bei Oxana Nowak und Andrea Schubert bedanke ich mich für ihre technische Unterstützung und für ihre ständige Hilfsbereitschaft. Den Mitarbeitern der Werkstatt für Feinmechanik, die bei kleineren und größeren Problemen des Laboralltags stets zur Stelle waren, gilt ebenfalls ein großer Dank.

Ich bedanke mich bei allen weiteren Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der AG Decher, insbesondere Dr. Anne-Kathrin Streit, Dr. Michael Netter, Dr. Stefanie Marzian, Dr. Konstantin Wemhöner, Nicole Silbernagel, Beatriz Ortiz-Bonnin, Tamina Cornelius und Isabella Genssler für das tolle Miteinander im Labor und den gemeinsamen Spaß, der das Arbeiten versüßt hat.

Ein großer Dank gilt Jonas Beckmann und meinen Freunden, die mich stets unterstützt haben und die Promotionszeit in Marburg sehr lebenswert gemacht haben.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie und meinen lieben Eltern, Marianne und Wolfgang, für ihre immerwährende Unterstützung.